

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-304987

(43)公開日 平成5年(1993)11月19日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	FI	技術表示箇所
C 1 2 P 21/08		8214-4B		
A 6 1 K 39/395	ADU T	9284-4C		
C 1 2 N 5/28		7236-4B	C 1 2 N 5/ 00	B
		8931-4B	15/ 00	A
審査請求 未請求 請求項の数29(全 20 頁) 最終頁に続く				

(21)出願番号 特願平4-162849

(22)出願日 平成4年(1992)6月22日

(31)優先権主張番号 特願平3-158859

(32)優先日 平3(1991)6月28日

(33)優先権主張国 日本(JP)

(31)優先権主張番号 特願平3-158860

(32)優先日 平3(1991)6月28日

(33)優先権主張国 日本(JP)

(31)優先権主張番号 特願平3-158861

(32)優先日 平3(1991)6月28日

(33)優先権主張国 日本(JP)

(71)出願人 000005968
三菱化成株式会社
東京都千代田区丸の内二丁目5番2号

(72)発明者 細川 斉子
神奈川県横浜市緑区鴨志田町1000番地 三
菱化成株式会社総合研究所内

(72)発明者 田川 俊明
神奈川県横浜市緑区鴨志田町1000番地 三
菱化成株式会社総合研究所内

(72)発明者 平川 容子
神奈川県横浜市緑区鴨志田町1000番地 三
菱化成株式会社総合研究所内

(74)代理人 弁理士 長谷川 一 (外1名)
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ヒト型モノクローナル抗体およびそれをコードする遺伝子、ハイブリドーマ並びに抗腫瘍剤

(57)【要約】

【構成】 癌患者癌所属リンパ節由来リンパ球とマウスミエローマ細胞との融合により得られるハイブリドーマから、癌細胞の膜表面を認識する新規なヒト型モノクローナル抗体を産生させる。該抗体をコードするcDNAをクローニングして、そのDNA配列およびそれより推定されるアミノ酸配列を決定する。該抗体を腫瘍細胞に対する毒素または制癌剤を内包するリポソームの表面に担持することにより、抗腫瘍剤が得られる。

【効果】 本発明で得られたヒト型モノクローナル抗体を用いることにより、癌組織に対する抗癌剤、毒素等のターゲティング治療が可能である。また、本発明の抗腫瘍剤は、ヒト型モノクローナル抗体を含むので、癌組織に特異的であり、連続投与が可能である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 癌患者由来リンパ球とマウスミエローマ細胞との細胞融合により産生され、癌細胞の膜表面抗原に特異的に結合するヒト型モノクローナル抗体。

【請求項2】 重鎖可変領域が、配列表の配列番号13、14および15のアミノ酸配列を含むことを特徴とする請求項1記載のモノクローナル抗体。

【請求項3】 重鎖可変領域が、配列表の配列番号16、17および18のアミノ酸配列を含み、かつ軽鎖可変領域が、配列表の配列番号19、20および21のアミノ酸配列を含むことを特徴とする請求項1記載のモノクローナル抗体。

【請求項4】 重鎖可変領域および軽鎖可変領域が、夫々、配列表の配列番号5および6のアミノ酸配列で表されることを特徴とする請求項1記載のモノクローナル抗体。

【請求項5】 重鎖可変領域が、配列表の配列番号22、23および24のアミノ酸配列を含み、かつ軽鎖可変領域が、配列表の配列番号25、26および27のアミノ酸配列を含むことを特徴とする請求項1記載のモノクローナル抗体。

【請求項6】 重鎖可変領域および軽鎖可変領域が、夫々、配列表の配列番号11および12のアミノ酸配列で表されることを特徴とする請求項1記載のモノクローナル抗体。

【請求項7】 請求項1に記載のモノクローナル抗体をコードするDNA。

【請求項8】 請求項2に記載のモノクローナル抗体をコードするDNA。

【請求項9】 重鎖可変領域が、配列表の配列番号28、29および30の塩基配列を含むことを特徴とする請求項8記載のDNA。

【請求項10】 請求項3に記載のモノクローナル抗体をコードするDNA。

【請求項11】 重鎖可変領域が、配列表の配列番号31、32および33の塩基配列を含み、かつ軽鎖可変領域が、配列表の配列番号34、35および36の塩基配列を含むことを特徴とする請求項10記載のモノクローナル抗体。

【請求項12】 請求項4に記載のモノクローナル抗体をコードするDNA。

【請求項13】 重鎖可変領域および軽鎖可変領域が、夫々、配列表の配列番号3および4の塩基配列で表されることを特徴とする請求項12記載のDNA。

【請求項14】 請求項5に記載のモノクローナル抗体をコードするDNA。

【請求項15】 重鎖可変領域が、配列表の配列番号37、38および39の塩基配列を含み、かつ軽鎖可変領域が、配列表の配列番号40、41および42の塩基配列を含むことを特徴とする請求項14記載のモノクロー

ナル抗体。

【請求項16】 請求項6に記載のモノクローナル抗体をコードするDNA。

【請求項17】 重鎖可変領域および軽鎖可変領域が、夫々、配列表の配列番号9および10の塩基配列で表されることを特徴とする請求項16記載のDNA。

【請求項18】 請求項1に記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

【請求項19】 請求項2に記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

【請求項20】 請求項3に記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

【請求項21】 請求項4に記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

【請求項22】 請求項5に記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

【請求項23】 請求項6に記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

【請求項24】 腫瘍細胞に対する毒素または制癌剤を内包するリボソームの表面に、請求項1記載のモノクローナル抗体を担持させた抗腫瘍剤。

【請求項25】 腫瘍細胞に対する毒素または制癌剤を内包するリボソームの表面に、請求項2記載のモノクローナル抗体を担持させた抗腫瘍剤。

【請求項26】 腫瘍細胞に対する毒素または制癌剤を内包するリボソームの表面に、請求項3記載のモノクローナル抗体を担持させた抗腫瘍剤。

【請求項27】 腫瘍細胞に対する毒素または制癌剤を内包するリボソームの表面に、請求項4記載のモノクローナル抗体を担持させた抗腫瘍剤。

【請求項28】 腫瘍細胞に対する毒素または制癌剤を内包するリボソームの表面に、請求項5記載のモノクローナル抗体を担持させた抗腫瘍剤。

【請求項29】 腫瘍細胞に対する毒素または制癌剤を内包するリボソームの表面に、請求項6記載のモノクローナル抗体を担持させた抗腫瘍剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、癌の診断、治療に使用し得る新規なモノクローナル抗体、それをコードするDNAおよびその抗体を産生するハイブリドーマ並びに該抗体と制癌剤等を封入したリボソームとを結合させることにより得られる抗腫瘍剤に関する。

【0002】

【従来の技術】 現在、固形癌に治療薬として十分な効果を示す抗腫瘍剤は存在しない。一方、古くから薬剤を適用組織、器官に集中させその効果を高めるターゲティングという概念があり、この手法により癌に対して特異的に薬物を集中できれば固形癌の治療も可能ではないかと予想されてきた。量産可能なマウスモノクローナル抗体の

作成法が確立（ミルシュタイン&ケーラー、Nature、1975）されて以来、その特異性を利用して抗癌剤、毒素等を癌組織に集積させる試みが多数なされ、その効果が認められてきている。

【0003】これまで抗体と薬剤の結合は、化学的に薬剤を修飾して結合する方法、すなわち抗体と薬剤を直接結合する方法や、デキストラン等の水溶性高分子を介し結合する方法等が試みられている。しかし、それらの方法では抗体1分子あたりに結合できる薬剤量が少ないこと、また薬剤の修飾により活性が低下するなどの問題が指摘されている。

【0004】一方、薬剤を修飾することなく大量に運ぶ手段として、リボソームに薬剤を封入しその表面に抗体を結合する方法、すなわち抗体結合リボソームが提案されており、その優れた抗腫瘍効果が多数報告されてきた。

【今野ら、Cancer Reserch 47, 4471 (1987)、橋本ら、特開昭58-134032号公報】。

【0005】

【発明が解決しようとする問題点】しかしながら、抗体に関しては、実際の治療においては、免疫応答に起因するアナフィラキシーなどの副作用から、連続投与が難しいとされるマウスモノクローナル抗体【A. Lo Bugliら Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 86, 4220, (1989)】に対し、ヒト型モノクローナル抗体の使用がより好ましいとされている。ところが、ヒト型モノクローナル抗体の作成法はマウスモノクローナル抗体の作成法と比較し、目的とする抗体を産生するヒトB細胞を効率的に得るための能動的免疫法が困難であること、抗体産生細胞を無限増殖化させる効率的方法が確立されていないことなどから、未だ充分に腫瘍細胞に反応するヒト型モノクローナル抗体を取得することは、困難な状況にある。

【0006】

【問題点を解決するための手段】本発明者らは、上記のような問題のない、癌組織に対し抗癌剤、毒素等のターゲティング治療を可能とするためのヒト型モノクローナル抗体を提供すべく鋭意検討した結果、特に癌細胞の膜表面にその抗原を持つ新規なヒト型モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを作製し、さらに該抗体を抗癌剤等を封入したリボソームに結合させることにより、ターゲティング療法に有効に使用し得る抗腫瘍剤が得られることを見だし、本発明を完成するに至った。

【0007】すなわち、本発明の要旨は、癌患者由来リンパ球とマウスミエローマ細胞との融合細胞により産生され、癌細胞の膜表面抗原に特異的に結合するヒト型モノクローナル抗体およびそれをコードする遺伝子、該モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ並びに該モノクローナル抗体を含有する抗腫瘍剤に存する。本発明

のヒト型モノクローナル抗体は、例えば、重鎖可変領域が配列表の配列番号13、14および15のアミノ酸配列を含むものが挙げられ、より具体的には重鎖可変領域が配列表の配列番号16、17および18のアミノ酸配列を含み、かつ軽鎖可変領域が配列表の配列番号19、20および21のアミノ酸配列を含むものや、重鎖可変領域が配列表の配列番号22、23および24のアミノ酸配列を含み、かつ軽鎖可変領域が配列表の配列番号25、26および27のアミノ酸配列を含むもの等が挙げられるが、これらに限定されるわけではない。もとより、本発明においては、上記抗原との反応性を損なわない範囲で一部のアミノ酸を置換、挿入、削除あるいは追加する等の改変を行ったものも本発明のモノクローナル抗体に含まれる。

【0008】以下、本発明を詳細に説明する。本発明に係るハイブリドーマは、A. Imamらの方法【Cancer Research 45, 263 (1985)】に準じて、まず、癌患者から摘出された癌所属のリンパ節から、リンパ球を単離し、ポリエチレングリコールを用いてマウスミエローマ細胞と融合して得られる。得られたハイブリドーマの上清を用いて、パラフォルムアルデヒド固定した各種癌細胞株に対し、エンザイムイムノアッセイにより陽性を示す抗体を産生するハイブリドーマを選択し、クローニングを行う。

【0009】さらに、ハイブリドーマの上清から、常法【R. C. Duhamelら、J. Immunol. Methods 31, 211 (1979)】によりモノクローナル抗体を精製、蛍光物質でラベルし、生癌細胞株、各種の赤血球、白血球等に対する反応性をフローサイトメトリーで検出することにより、制癌細胞株に対しては反応性を示す抗体を、赤血球、白血球に対しては、反応性を示さない抗体を選別する。また、癌患者から摘出される癌組織から単離される癌細胞、および同一患者の同一組織の非癌部から単離される正常細胞に対する反応性を比較して、癌細胞に、より多量の抗体が結合し、正常細胞には反応がないか、もしくは健康人由来の抗体と同程度の反応性しかない抗体を選別する。

【0010】かくして選別されたハイブリドーマが産生する抗体をコードするDNAの塩基配列は、たとえば、以下の方法によって得られる。抗体産生ハイブリドーマから、チオシアン酸グアニジン塩化リチウム法【Casaraら、DNA, 2, 329 (1983)】でmRNAを調製して、オリゴ(dT)プライマーを用いてそのcDNAライブラリーを作製する。次いで、cDNAに(dG)テーリングを行い、このdGテールにハイブリダイズするポリCと、既に遺伝子が取得されているヒト抗体重鎖遺伝子、軽鎖遺伝子の各々共通な配列部分をプローブとしてPCR法によって、抗体をコードするcDNAを増幅させる。その後、DNAの末端平滑化を行い、電気泳動法によってゲルから切りだしたDNAをp

UC119等のクローニングベクターに挿入し、Sangerらのジデオキシ法〔Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 74, 5463, (1977)〕によってその塩基配列が決定される。

【0011】その結果、本発明の抗体は、例えば、重鎖可変領域が配列表の配列番号13、14および15のアミノ酸配列を含むものが挙げられ、具体的には重鎖可変領域が配列表の配列番号16、17および18のアミノ酸配列を含み、かつ軽鎖可変領域が配列表の配列番号19、20および21のアミノ酸配列を含むものや、重鎖可変領域が配列表の配列番号22、23および24のアミノ酸配列を含み、かつ軽鎖可変領域が配列表の配列番号25、26および27のアミノ酸配列を含むもの等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0012】配列表の配列番号13、14および15のアミノ酸配列は、16、17および18のアミノ酸配列、22、23および24のアミノ酸配列は、重鎖可変領域の中でも『超可変領域』と呼ばれ、同様に配列表の配列番号19、20および21のアミノ酸配列、25、26および27のアミノ酸配列は、軽鎖可変領域の中でも『超可変領域』と呼ばれる。かかる領域は、免疫グロブリンの抗体としての特異性、抗原決定基と抗体の結合親和性を決定するものである。従って本願発明においては、かかる超可変領域以外の重鎖可変領域は他の抗体由来であっても構わない。

【0013】本願発明において特に好適なモノクローナル抗体は、重鎖可変領域および軽鎖可変領域が夫々配列表の配列番号5および6のアミノ酸配列で表されるもの、並びに配列番号11および12のアミノ酸配列で表されるものである。重鎖および軽鎖の定常領域の塩基配列はNucleic Acids Research 14, 1779 (1986)、The Journal of Biological Chemistry 257, 1516 (1982) およびCell 22, 197 (1980) に記載のものと同じ配列を有する。

【0014】本抗体は、本抗体を産生するハイブリドーマを牛胎児血清含有eRDF、RPMI 1640培養液等を用いて培養するか、または、配列表の配列番号3および4、もしくは9および10等の塩基配列で表わされる可変領域をコードするDNAにさらに重鎖および軽鎖の定常領域をコードするDNAが夫々連結された遺伝子を化学合成し、その遺伝子の発現を可能とする公知の種々の発現ベクター、例えば、動物細胞における発現ベクターとして、pKCRH2〔三品ら、Nature, 307, 605, (1984)〕から図1または図2に示した手順で構築することができるpKCR(ΔE)/HとpKCRDに挿入し、CHO細胞(チャイニーズハイスター 卵巣細胞)等の宿主中で発現させることにより得ることができる。例えば、重鎖遺伝子の両端にHind III部位を付加したものをpKCR(ΔE)/H

のHind III部位に挿入し、またこのプラスミドのSal I部位にDHFR遺伝子等の選択マーカー遺伝子を挿入する。一方、軽鎖遺伝子の両端にはEcoRI部位を付加したものをpKCRDのEcoRI部位に挿入し、さらにこのプラスミドのSal I部位にもDHFR遺伝子を挿入する。両プラスミドをCHOdhfr⁻〔Urlaub G. & Chasin L. A. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 77, 4216 (1980)〕等の細胞にリン酸カルシウム法で導入し、ヌクレオチドを含まないαMEM培養液等で増殖する細胞から、さらに抗体を産生する細胞を選別することによって得ることができる。抗体は、これらの細胞を培養した培養液から、Protein Aをセルロファイン、アガロース等の支持体に結合させたカラム等に吸着し、溶出させること等によって精製される。

【0015】本発明の抗腫瘍剤において、上記抗体を担持するリボソームは二重の脂質層からなり、該脂質層が①多重層になったもの、あるいは②一層のものいずれも使用することができる。構成成分としては、フォスファチジルコリン、コレステロール、フォスファチジルエタノールアミン、さらに電荷をあたえる物質としてのフォスファチジン酸等が用いられる。例えば、構成成分の使用割合として、フォスファチジルコリン1molに対しコレステロールは0.3~1mol、好ましくは0.4~0.6mol、フォスファチジルエタノールアミンは0.01~0.2mol好ましくは0.02~0.1mol、フォスファチジン酸は0~0.4mol好ましくは0~0.15molの組成比を用いることができる。リボソームの製造方法には公知の方法を用いることができる。たとえば溶媒を除去した脂質混合物をホモジナイザー等で乳化し、凍結融解後、マルチラメラリボソームを得る。さらに適当な粒径に調整するために超音波処理、高速ホモジナイズ、あるいは均一ポアを持つメンブランで加圧ろ過する方法〔Hope M. J.ら Biochimica et Biophysica Acta 812, 55 (1985)〕等で調整する。この時、好ましいサイズとして30nmから200nmのリボソームが選択される。

【0016】リボソームに内封させる薬剤としては、アドリアマイシン、ダウノマイシン、マイトマイシン、シスプラチン、ビンクリスチン、エビルピシン、メトトレキセート、5Fu、マクラシノマイシン等の抗癌剤、リシンA、ジフテリアトキシン等の毒素、アンチセンスRNA等を用いることができる。薬剤の封入は、脂質を薬剤水溶液で水和することでリボソームに封入することができる。またアドリアマイシン、ダウノマイシン、エビルピシンについては、pH勾配を利用したリモートローディング法〔Lawrence D. M.ら Cancer Research 49, 5922 (1989)〕を

用いて封入することもできる。

【0017】このリボソーム表面上にモノクローナル抗体を結合させる方法としては、精製固体に疎水性の物質をつけることでリボソームに挿入させる方法、ホスファチジルエタノールアミンと抗体をグルタルで架橋させる方法等もあるが、好適には、抗体をチオール化した後、マレイミド基を導入した脂質を含むリボソームを作製し、制癌剤または腫瘍細胞に対する毒素を封入したマレイミド基を有するリボソームと反応させることによってリボソームの表面に結合することができる。また、残存マレイミド基には、チオール化したポリアルキレングリコール部分を含む化合物等を反応させることによってリボソームの表面修飾を行うことも可能である。

【0018】抗体へのチオール基の付与は、固体のアミノ基に対し通常タンパク質のチオール化に用いるN-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート (SPDP) や、イミノチオラン、メルカプトアルキルイミデート等の化合物を用いて行う方法、または抗体の内在性ジチオール基を還元してチオール基とする方法が用いられるが、内在性チオール基を用いる方法が活性維持の点からより好ましい。抗体は、ペプシン等の酵素でF(ab)'₂化し、さらにジチオスレイトール (DTT) 等で還元し、F(ab)'₂化して新たに生ずる1~3個のチオール基をリボソームとの結合反応に供することができる。マレイミド基含有リボソームとチオール化抗体の結合は中性の緩衝液 (pH 6.5-7.5) 中、2~16時間反応することで達成される。

【0019】本発明の抗腫瘍剤の製剤化には、公知の方法つまり、脱水法 (特表平 2-502348号公報)、安定化剤を加え液剤として用いる方法 (特開昭 64-9331号公報)、凍結乾燥法 (特開昭 64-9931号公報) 等の製剤化法を用いることができる。本発明の抗腫瘍剤は、血管内投与法や、腹腔内等、局所投与法で用いることができ、その投与量は、リボソームに含有された薬剤によって、それぞれ最適な量とすることができる。アドリマイシン封入体を例に取れば投与量はアドリマイシン量として50mg/kg以下、好ましくは10mg/kg以下、より好ましくは5mg/kg以下で用いることができる。

【0020】

【実施例】以下、実施例により本発明についてより詳細に説明するが、その要旨を越えない限り以下に限定されるものではない。

【0021】実施例1

(癌患者癌所属リンパ節由来リンパ球とマウスミエロマとの細胞融合によるヒト型モノクローナル抗体GAH産生株の樹立)

(1) リンパ球の調製

大腸癌患者から摘出された癌所属リンパ節をハサミとメスによって細かくほぐし、さらに培養液A (eRDF

〔極東製薬工業社製〕+50μg/mlゲンタマイシン硫酸塩) 中でステンレスネットを用いて細胞を分散させた。この細胞懸濁液を1000rpmで10分間遠心分離して上清を除去し、さらに新鮮な培養液Aに懸濁して遠心洗浄を行い、最終的に 2.6×10^7 個の細胞を得た。

【0022】(2) 細胞融合

リンパ球は、ポリエチレングリコール (ペーリンガー/マンハイム社製) を用いマウスミエロマ細胞 (1×10^7 細胞) と常法に従い融合した。融合した細胞は、培養液Aに10μMヒポキサンチン、0.04μMアミノプテリン、1.6μMチミジン、10%ウシ胎児血清 (FCS) を添加した培養液 (HAT添加培養液) にリンパ球数が 5.4×10^5 /mlの密度になるよう懸濁し、100μlずつ96ウェルプレートに接種し、37℃でCO₂ インキュベーター中で培養した。培養液は、適時、半量ずつ上記のHAT添加培養液で置換してハイブリドーマのコロニーが出現するまで培養を行った。ハイブリドーマのコロニーの出現は、すべてのウェルに確認された。各ウェルの培養上清について、下記試験例1の方法に従い、固定癌細胞株、即ち、大腸癌株C-1 [佐藤ら、医学のあゆみ、96, 876, (1976)] [免疫生物研究所から入手]、胃癌株MKN45 [内藤ら、癌と化学療法、5, 89, (1978)] [免疫生物研究所から入手] に対する反応性を測定した。陽性ウェルの出現率は、C-1株に対しては、7.3% (35ウェル)、MKN45株に対しては、4.6% (22ウェル) であり、両細胞株に反応性を示したウェルは、6ウェルであった。この両細胞株に反応性が認められたウェルのうちから、ハイブリドーマのクローニングを行った。クローニングは、限界希釈法により、3回行ない、ハイブリドーマクローンGAHを樹立した。

【0023】実施例2

(モノクローナル抗体GAHの精製と標識化)

(1) ハイブリドーマGAHの培養とモノクローナルGAH抗体の精製

牛胎児血清をプロテインA-アガロース [レプリゲン社製] カラムにかけ、そのカラムを素通りさせてプロテインA-アガロースカラムに吸着する物質を除去した血清を作成した。ハイブリドーマGAHの培養には、この血清を3%添加したeRDF [極東製薬社製] 培養液を用いた。GAH抗体は、ハイブリドーマGAHを培養した培養液をプロテインA-アガロースカラムにかけ、抗体を吸着させ、その後溶出させることによって精製した。上記の血清を培養に用いることによって、血清由来の抗体、プロテインA-アガロースに吸着する物質の混入がない精製GAH抗体が得られた。GAH抗体は、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) で純粋なIgGであることが確認された。

【0024】(2) GAH抗体の蛍光標識化

精製したGAH抗体に、Coons A. H. の方法により、蛍光物質であるFITC（フルオレセインイソチオシアネート）を標識した。炭酸緩衝液（pH9.5）に抗体を透析し、FITC溶液を反応させた後、ゲル濾過法によって蛍光標識された抗体と遊離のFITCを分離した。蛍光標識された抗体が回収されてきた画分の吸光度、OD_{280nm}とOD_{495nm}を測定し、標識率を算出した。標識抗体の抗体とFITCの結合モル比（F/P比）は、0.93であった。

【0025】試験例1

（ヒト型モノクローナル抗体の癌細胞株への反応性の検討）

（1）癌細胞株と維持

ヒト癌細胞株として、大腸癌株C-1、胃癌株MKN45の各細胞株を用いた。これらの細胞株は、培養液B（10%FCS含有eRDF）で37℃、5%CO₂の条件で維持、増殖させた。

【0026】(2) 癌細胞株に対する反応性の検討

a. 固定癌細胞株を用いた反応性の測定

癌細胞株は、96ウェルプレートで3日から4日間、一層になるまで培養を行い、上清を除去後、10mMリン酸緩衝液pH7.4、0.15M NaCl溶液（PBS）で2回洗浄したのち、2%-パラホルムアルデヒド固定（室温、20分）を行った。PBSで5回洗浄したのち、5%-BSA（牛血清アルブミン）含有PBS溶液を200μl/ウェル入れ、37℃、2時間放置し、ブロッキングを行った。このプレートをPBSで5回洗浄し、これに50μlのハイブリドーマ培養上清を加えた。37℃、2時間反応させたのち、PBSで5回洗浄し、50μlのアルカリホスファターゼを結合したヒト抗体に対するヤギ抗体（1000倍希釈、カベル社製）を加え、37℃、1時間の反応を行った。反応後、PBSで5回洗浄したのち、25mM p-ニトロフェニルホスフェート含有0.05M炭酸塩緩衝液-1mM*

* MgCl（pH9.5）を50μl/ウェル加え、室温で1時間ないし一夜反応させたのち、405nmにおける吸光度をマイクロプレートフォトメーター（コロナ社製）によって測定した。上記実施例1の（2）の通り、反応性を検討した培養癌細胞株、C-1、MKN45に陽性が確認できたウェルからクローニングを行い、ハイブリドーマ株GAHを得た。GAHの培養上清から精製した抗体についても同様の反応性が得られた。

【0027】b. 生癌細胞に対する反応性

10 フラスコまたはシャーレで培養した癌細胞の上清を除去し、0.02%-EDTA含有PBS溶液を加えて室温30分放置し、細胞を浮遊化させた。この細胞は、培養液Bで遠心洗浄し、約1×10⁶/200μlの細胞密度となるよう、上記実施例2の（2）で得た蛍光標識したGAH抗体（最終濃度50μg/ml）を含有する血清（健康人由来）に懸濁し、0℃、60分間反応させた。その後、2000rpmで2分間遠心して上清を除去し、さらに細胞を1mlのPBSに懸濁して遠心洗浄を行なった後、細胞を10μg/mlのプロビジウムアイオダイド（PI）を含有するPBS300μlに懸濁した。この細胞懸濁液をフローサイトメーター（FCM）、FACS440（ベクトン・ディッキンソン社製）にかけ、細胞個々に結合した蛍光量（FITC及びPI）を測定した。系に含まれていた死細胞には、PIが取り込まれてその核酸中に入り込み、PIの蛍光を発するので、データ処理上PIの蛍光を持つ死細胞群を除去することができる。蛍光量（5種）のマーカ（クオンタティブキット）（オーソ・ダイアグノスティックシステムズ社製）をFCMに同一条件下でかけ、それを指標にして細胞1個当たりの平均結合FITC量を算定し、その値と、実施例2の（2）で算出した標識抗体のF/P比から、生癌細胞の1個当たりの平均結合抗体数を算定し、その結果を表1に示した。

【0028】

【表1】

表 1

癌細胞株	抗 体	
	GAH	Control IgG
MKN45	3.5×10 ⁴	0.15×10 ⁴
C-1	0.6×10 ⁴	<0.1×10 ⁴

GAH抗体を用いた場合、胃癌細胞株、大腸癌細胞株に対し、コントロールとして用いた健康人血清由来IgG抗体（GAHと同様の方法によって蛍光標識化した）の約6～23倍量の抗体が結合した。

【0029】試験例2

（ヒト型モノクローナル抗体GAHの血液系細胞に対す

る反応性）健康人7名および癌患者3名の抹消血から、木下の方法〔赤血球系細胞の分離、新版日本血液学全書13,800（1979）〕によって、赤血球を分離した。白血球については、健康人抹消血をヘパリンを加えて採血し、10mlに対して2mlの6%デキストラン生理食塩水溶液を加え、混合し、室温で50分放置し

11

て血漿層を得、1500rpm、5分間の遠心によって白血球を得た。これらの細胞に対する反応性は、生癌細胞株に対する反応性を測定した方法と同様、FCMによって測定した。ただしPIは無添加である。白血球については、さらにFCMでの細胞の前方散乱と側方散乱から、主細胞種である、小リンパ球 (lymphocyte*)

表 2

12

*e)、顆粒球 (granulocyte)、単球 (monocyte)、血小板の群に分け [Bio/Technology 3, 337 (1985)]、それぞれに対する反応性を調べた。結果を表2に示した。

【0030】

【表2】

細胞	抗体	
	GAH	Control IgG
白血球		
小リンパ球	陰性	陰性
顆粒球	0.49×10^4 *	0.48×10^4 *
単球	0.41×10^4 *	0.43×10^4 *
血小板	陰性	陰性
赤血球 (10種)	陰性	陰性

* : 細胞1個当たりの平均抗体結合数

GAH抗体は、赤血球、小リンパ球には反応性が認められなかった。顆粒球、単球については、コントロール抗体 (試験例1と同様) の反応性と同等であった。

【0031】試験例3

(ヒト型モノクローナル抗体GAHの新鮮癌組織、非癌部組織由来細胞に対する反応性) GAH抗体の癌細胞結合特異性を検討するため、癌患者の癌組織と同時に摘出された同一患者、同一臓器の新鮮組織から、細胞を単離し、それぞれの細胞に対するGAH抗体の反応性を測定した。組織からの細胞の単離は、時田らの方法 [癌の臨

※いて細切し、1mmのステンレスメッシュに移し、培養液をいれたシャーレのなかでふるい、メッシュを通過した微小細胞集塊のはいった液を1000rpmで遠心し、浮遊した脂肪と懸濁した壊死部分を捨て、遠心洗浄を繰り返した。細胞塊を23ゲージのカテラン針につけた注射器でバンピングして分散した。この様にして得られた細胞に対する反応性は、上記した生癌細胞株に対する反応性を検討した場合と同様、FCMによって測定した。結果を表3に示した。

【0032】

【表3】

表 3

抗体	大腸癌		胃癌 (Borr.IV)	
	癌	非癌	癌	非癌
GAH	1.1×10^4	0.03×10^4	180×10^4	4.6×10^4
Control	0.15×10^4	0.04×10^4	3.5×10^4	0.9×10^4
IgG				

* : いずれも細胞1個あたりの平均抗体結合数を示す。

GAH抗体の癌組織由来細胞に対する平均結合抗体数は、非癌部由来細胞に対する結合数と比較して顕著に多く、また、コントロール抗体と比較した場合でも胃癌で51倍、大腸癌で7倍であり、GAH抗体が癌細胞の膜上により多く出現してくる抗原を認識していることが示唆された。

【0033】実施例3

(ヒト型モノクローナル抗体GAH軽鎖のサブクラス決定) 実施例2の(1)で得られたGAH抗体を還元状態でSDS-PAGEを行い、重鎖と軽鎖に分離して泳動されたタンパクをトランスファーマンブレン (Polyvinylidene difluoride膜)

【ミリオア社製】にブロットし、この膜を5%BSA溶液でブロッキングした後、ヒトκ鎖、またはヒトλ鎖に

対するヤギ抗体にパーオキシダーゼが結合したもの〔カベル社製〕を反応させた。洗浄後、酵素基質として0.015% H_2O_2 含有0.05% (w/v) 4-クロロナフトール溶液を反応させた。その結果、GAH抗体の軽鎖は、抗ヒト κ 鎖抗体と反応し、発色によってバンドが出現し、 κ 鎖であることが示された。

【0034】(ヒト型モノクローナル抗体GAH遺伝子の取得と塩基配列の決定)

a. ポリメラーゼチェーン反応(以下、PCRと略す)法による抗体GAHをコードするcDNAの調製
実施例1の(2)で得られたGAH抗体産生ハイブリドーマよりチオシアン酸グアニジン-塩化リチウム法(DNA 2, 329 (1983))に従いポリ(A)を有するRNAを下記の如く調製した。ハイブリドーマ 1×10^7 の細胞を5Mチオシアン酸グアニジン、10mM EDTA、50mMトリス-塩酸(pH7)および8% (v/v) β -メルカプトエタノールからなる溶液7.5mlに可溶化し、さらに、1g/2.5mlになるよう塩化セシウムを加え、混合した。この可溶化物8.0mlを遠心管に入っている5.7M塩化セシウム溶液3.5ml上に静かにのせ、Hitachi RPS40Tローターにて30,000rpm、23.5時間遠心後RNAを沈澱として回収した。このRNAの沈澱を0.1%ラウリル硫酸ナトリウム、1mM EDTA、10mMトリス-塩酸(pH7.5)からなる溶液400 μ lに溶解しフェノール-クロロホルムで抽出後、エタノール沈澱により回収した。得られたRNA約64 μ gを10mMトリス-塩酸(pH8.0)および1mM EDTAからなる溶液40 μ lに溶かした。このうち21 μ lからmRNAピュリフィケーションキット〔ファルマシア(Pharmacia)社製〕によって、ポリ(A)を有するmRNA約2.64 μ gを得た。

【0035】このポリ(A)mRNA 1.1 μ gを10 μ lの水に溶かし、オリゴd(T)12-18プライマー〔ファルマシア社製〕1.5 μ g、10mM 4dNTP〔宝酒造社製〕3 μ l、逆転写酵素〔ライフサイエンス(Life Science)社製〕40u、RNA分解酵素阻害剤〔宝酒造社製〕30u、5倍濃度の逆転写酵素緩衝液〔250mMトリス-塩酸(pH8.3)、40mM塩化マグネシウム、250mM塩化カリウム〕6 μ lを加え、水を加えて計30 μ lの系とし、41℃で1時間反応させた。上記反応液からエタノール沈澱を行って、cDNAを得た。

【0036】得られたcDNAを15.3 μ lの水に溶解した。この溶液に、5倍濃度の末端デオキシヌクレオチド転位酵素緩衝液〔250mMトリス-塩酸(pH7.5)、50mM塩化マグネシウム〕4.8 μ l、末端デオキシヌクレオチド転位酵素〔ファルマシア社製〕12u、10mM dGTP〔宝酒造社製〕2.4 μ l

を加え、計24 μ lの系とし、37℃で1.5時間反応させて、cDNAの3'末端にポリd(G)を付加した。その後70℃で15分間加熱して酵素を失活させた。

【0037】この様にして得られたcDNAを基質としてPCRを行った。PCRは、パーキン エルマー シータス ディー エヌ エー サーマル サイ클アー(Perkin Elmer Cetus DNA Thermal Cycler)を使用して、使用説明書に基づいて行った。すなわち上記反応終了液2 μ lに重鎖の可変領域をコードするcDNAを増幅させるためのプライマーとしてcDNA 3'末端に付加したdGテールにハイブリダイズするポリC(15ヌクレオチド)40pmolesと、ヒトIgG抗体ですべて共通である。可変領域の一部(配列番号:5のアミノ酸配列の113番~119番)から定常領域にまたがる領域に対応する一鎖DNAプライマー(配列番号:1,37ヌクレオチド)〔Nucleic Acids Research 14, 1779 (1986)〕25pmoles、また、軽鎖の可変領域をコードするcDNAを増幅させるためのプライマーとしてポリC 40pmolesと、ヒト κ 鎖のJ領域の一部(配列番号:6のアミノ酸配列の113番~114番)から定常領域にまたがる領域に対応する一鎖DNAプライマー(配列番号:2,21ヌクレオチド)〔The Journal of Biological Chemistry 257, 1516 (1982)、Cell 22, 197 (1980)〕40pmoles、10倍濃度のPCR緩衝液(100mMトリス-塩酸(pH8.3)、500mM塩化カリウム、15mM塩化マグネシウム、0.1% (w/v)ゼラチン)10 μ l、10mM 4dNTP〔宝酒造社製〕2 μ l、Taq DNAポリメラーゼ〔宝酒造社製〕2.5uに、水を加え、100 μ lの系とした。反応は、94℃、1分間(変性ステップ)、55℃、2分間(アニーリングステップ)、72℃、3分間(伸長ステップ)のインキュベーションを30サイクル行った後、さらに72℃、7分間インキュベーションを行った。得られた反応液をエタノール沈澱し、その沈澱物を30 μ lの水に溶かし、クレノー断片〔宝酒造社製〕2u、1mM 4dNTP 4 μ l、10倍濃度の末端平滑化緩衝液(500mMトリス-塩酸(pH7.6)、100mM塩化マグネシウム)4 μ lを加え、計40 μ lの反応系とし、37℃で30分間反応させ、2本鎖の平滑末端をもったcDNAを得た。

【0038】b. cDNAの塩基配列の決定
得られたcDNA溶液を2%アガロース電気泳動により解析した結果、約500bpのバンドが認められた。この約500bpのバンドを常法に従ってアガロースゲルより切り出し、クローニングベクターのpUC119のSma I部位に挿入してジデオキシ法によってその塩基

配列を決定した。その結果、該PCRフラグメントの塩基配列中、重鎖及び軽鎖の可変領域をコードする塩基配列は、夫々、配列番号：3、配列番号：4に示したとおりであった。決定した塩基配列から予想される前記ハイブリドーマが産生するGAH抗体の重鎖及び軽鎖の可変領域のアミノ酸配列は、夫々、配列番号：5及び配列番号：6で示す通りである。また、塩基配列の結果から、GAH抗体のサブクラスはIgG1であることが判明した。このアミノ酸配列及び塩基配列が明らかにされたDNA断片は、上述の様な方法をくり返すことなく、DNA合成機により再現性よく取得することができる。

【0039】実施例4

(癌患者癌所屬リンパ節由来リンパ球とマウスミエローマとの細胞融合によるヒト型モノクローナル抗体1-3-1産生株の樹立)

(1) リンパ球の調製

肺癌患者から摘出された癌所屬リンパ節から、実施例1の(1)と同様にしてリンパ球の調製を行い、最終的に 3×10^7 の細胞を得た。

【0040】(2) 細胞融合

リンパ球は、ポリエチレングリコール(ペーリンガー/マンハイム社製)を用いマウスミエローマ細胞(8×10^6 細胞)と常法に従い融合した。融合した細胞は、実施例1の(2)と同様に、HAT添加培養液にリンパ球数が 5.2×10^5 /mlの密度になるよう懸濁し、100 μ lずつ96ウェルプレートに接種し、適時、半量ずつ上記のHAT添加培養液で置換してハイブリドーマのコロニーが出現するまで培養を行った。ハイブリドーマのコロニーの出現は、すべてのウェルに確認された。各ウェルの培養上清について、実施例1の(2)と同様に試験例1の(2)のaに示した方法で、固定癌細胞株即ち大腸癌株C-1、胃癌株MKN45に対する反応性を測定した。陽性ウェルの出現率は、C-1株に対しては、16.3%(94ウェル)、MKN45株に対しては、6.3%(36ウェル)であり、両細胞株に反応性を示したウェルは、4ウェルであった。この両細胞株に反応性が認められたウェルのうちから、ハイブリドーマのクローニングを行った。クローニングは、限界希釈法により、3回行ない、ハイブリドーマクローン1-3-1を樹立した。

【0041】実施例5

(モノクローナル抗体1-3-1の精製と標識化)

(1) ハイブリドーマ1-3-1の培養とモノクローナル抗体1-3-1の精製

ハイブリドーマ1-3-1の培養には、実施例2の

(1)に示した血清を3%添加したeRDF[極東製薬社製]培養液を用いた。1-3-1抗体は、ハイブリドーマ1-3-1を培養した培養液をプロテインA-アガロースカラムにかけ、抗体を吸着させ、その後溶出させることによって精製した。1-3-1抗体は、SDS-

PAGEで純粋なIgMであることが確認された。

【0042】(2) 1-3-1抗体の蛍光標識化
精製した1-3-1抗体に、実施例2の(2)と同様にしてFITCを標識し、蛍光標識された抗体が回収されてきた画分の吸光度、OD_{280nm}とOD_{495nm}を測定し、標識率を算出した。F/P比は、6.7であった。

【0043】試験例4

(ヒト型モノクローナル抗体の癌細胞株への反応性の検討)

(1) 癌細胞株と維持

ヒト大腸癌株C-1、胃癌株MKN45は、試験例1の(1)と同様、培養液Bで37℃、5%CO₂の条件で維持、増殖させた。

【0044】(2) 癌細胞株に対する反応性の検討

生癌細胞に対する反応性

フラスコまたはシャーレで培養した癌細胞の上清を除去し、0.02%-EDTA含有PBS溶液を加えて室温30分放置し、細胞を浮遊化させた。この細胞は、培養液Bで遠心洗浄し、約 1×10^6 /200 μ lの細胞密度となるよう、PBSに懸濁し、最終濃度が、50 μ g/mlとなるよう上記実施例5の(1)で得られた1-3-1抗体を加え、0℃、60分間反応させた。その後、2000rpmで2分間遠心して上清を除去し、1%BSA含有PBSでFITC標識化抗ヒト抗体[カベル社製]を500倍に希釈した溶液、200 μ lを添加して細胞を懸濁させ、さらに0℃、60分間反応させた。反応後、2000rpmで2分間遠心して上清を除去し、細胞を1mlのPBSに懸濁して遠心洗浄を行なった後、細胞を10 μ g/mlのPIを含有するPBS300 μ lに懸濁した。この細胞懸濁液をFCMにかけ、個々の細胞に結合した蛍光量(FITC及びPI)を測定した。1-3-1抗体の大腸癌細胞株C1、胃癌細胞株MKN45それぞれに対する反応性を図3及び図4に示した。横軸に癌細胞1個当たりの蛍光強度、縦軸に癌細胞数が示されている。コントロールとして、市販のヒトIgM抗体[カベル社製]を用い、同様に癌細胞株に対する反応性を調べた。図中、1-3-1抗体の反応性は点線で、コントロールは実線で示した。これより、1-3-1抗体は癌細胞に対し強い結合性を有することがわかる。

【0045】試験例5

(ヒト型モノクローナル抗体1-3-1の新鮮癌組織、非癌部組織由来細胞に対する反応性) 1-3-1抗体の癌細胞結合特異性を検討するため、癌患者の癌組織と同時に摘出された同一患者、同一臓器の新鮮組織から、細胞を単離し、それぞれの細胞に対する1-3-1抗体の反応性を測定した。組織からの細胞の単離は、上記試験例3と同様時田らの方法に従った。この様にして得られた細胞に対する反応性は、上記した生癌細胞株に対する反応性を検討した場合と同様、FCMによって測定し

た。ただし、これらの細胞は、培養液Bで遠心洗浄し、約 $1 \times 10^6 / 200 \mu\text{l}$ の細胞密度となるよう、上記実施例5の(2)で得た蛍光標識した1-3-1抗体(最終濃度 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$)を含有する血清(健康人由来)に懸濁し、 0°C 、60分間反応させた後、 2000 rpm で2分間遠心して上清を除去し、細胞を 1 ml のPBSに懸濁して遠心洗浄を行ない、細胞を $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ のPIを含有するPBS $300 \mu\text{l}$ に懸濁した。その後、この細胞懸濁液をFCMにかけ、細胞個々に結合*

表 4

*した蛍光量(FITC及びPI)を測定した。蛍光量(5種類)のマーカー(クオンタティブキット:前述)をFCMに同一条件下でかけ、それを指標にして細胞1個当たりの平均結合FITC量を算定し、その値と実施例5の(2)で算出した標識抗体のF/P比から生癌細胞の1個当たりの平均結合抗体数を算定し、その結果を以下表4に示す。

【0046】

【表4】

抗体	大腸癌		胃癌	
	癌	非癌	癌	非癌
1-3-1	1.5×10^4	0.04×10^4	1.8×10^3	0.05×10^3
Control	0.15×10^4	0.04×10^4	0.2×10^3	0.3×10^3

1-3-1抗体の非癌部由来細胞に対する反応性は、コントロールとした健康人抹しう血由来抗体(1-3-1と同様の方法により蛍光標識化)と同程度かそれ以下であったのに対し、癌組織由来細胞に対する平均結合抗体数は、非癌由来細胞に対する結合数と比較して顕著に多く、また、コントロール抗体と比較した場合には、胃癌、大腸癌とも10倍であり、1-3-1抗体が癌細胞の膜上により多く出現してくる抗原を認識していることが示唆された。

【0047】実施例6

(ヒト型モノクローナル抗体1-3-1軽鎖のサブクラス決定)抗体としてGAH抗体のかわりに、実施例5の(1)で得られた1-3-1抗体を用いた以外は、前記実施例3に示した方法と同様にして、1-3-1抗体軽鎖のサブクラスを決定した。その結果、1-3-1抗体の軽鎖は、抗ヒト λ 鎖抗体と反応し、発色によってバンドが出現し、 λ 鎖であることが示された。

【0048】(ヒト型抗体1-3-1遺伝子の取得と塩基配列の決定)

a. ポリメラーゼチェーン反応(以下、PCRと略す)法による抗体1-3-1をコードするcDNAの調製
実施例4の(2)で得られた1-3-1抗体産生ハイブリドーマよりチオシアン酸グアニジン-塩化リチウム法(DNA 2,329(1983))に従いポリ(A)を有するRNAを調製した。用いたハイブリドーマの細胞数が 2×10^8 である以外は、すべて実施例3で示したとおりにして、該RNAを調製した。得られたRNA約 1.8 mg を 10 mM トリス-塩酸(pH 8.0)および 1 mM EDTAからなる溶液 1 ml に溶かした。このうち $230 \mu\text{l}$ からmRNAピュリフィケーションキット(前述)によって、ポリ(A)を有するmRNA約 $20 \mu\text{g}$ を得た。

20 【0049】このポリ(A)mRNA $4.3 \mu\text{g}$ を $10 \mu\text{l}$ の水に溶かし、実施例3と同様、オリゴd(T)12-18プライマー $0.6 \mu\text{g}$ 、 10 mM 4dNTP $2 \mu\text{l}$ 、逆転写酵素 40 u 、RNA分解酵素阻害剤 30 u 、5倍濃度の逆転写酵素緩衝液 $6 \mu\text{l}$ を加え、水を加えて計 $30 \mu\text{l}$ の系とし、 42°C で1時間反応させた。上記反応液からエタノール沈澱を行って、cDNAを得た。

30 【0050】得られたcDNAを $20 \mu\text{l}$ の水に溶解した。このうちの $10 \mu\text{l}$ に、5倍濃度の末端デオキシヌクレオチド転位酵素緩衝液 $5 \mu\text{l}$ 、末端デオキシヌクレオチド転位酵素 11 u 、 10 mM dGTP $2.5 \mu\text{l}$ を加え、水 $6.5 \mu\text{l}$ を加え計 $25 \mu\text{l}$ の系とし、 37°C で1時間反応させて、cDNAの3'末端にポリd(G)を付加した。その後 70°C で10分間加熱して酵素を失活させた。

50 【0051】この様にして得られたcDNAを基質としてPCRを行った。PCRは、上記反応終了液 $2.5 \mu\text{l}$ に重鎖の可変領域をコードするcDNAを増幅させるためのプライマーとしてcDNA 3'末端に付加したdGテールにハイブリダイズするポリC(14ヌクレオチド) 25 pmol と、IgMの定常領域の塩基配列部分に対応する一鎖DNAプライマー(配列番号:7, 17ヌクレオチド)[Nucleic Acids Research 18, 4278(1990)] 25 pmol と、また、軽鎖の可変領域をコードするcDNAを増幅させるためのプライマーとしてポリC 25 pmol と、 λ 鎖の定常領域の塩基配列部分に対応する一鎖プライマー(配列番号:8, 19ヌクレオチド)[Nature 294, 536(1981)] 25 pmol を用いた以外はすべて実施例3で示した方法と同様に行い、本鎖の平滑末端をもったcDNAを得

た。

【0052】 b. cDNAの塩基配列の決定

得られたcDNA溶液を2%アガロース電気泳動により解析した結果、約500bpのバンドが認められた。この約500bpのバンドを常法に従ってアガロースゲルより切り出し、クローニングベクターのpUC119のSma I部位に挿入してジデオキシ法によってその塩基配列を決定した。その結果、該PCRフラグメントの塩基配列中、重鎖及び軽鎖の可変領域をコードする塩基配列は、夫々、配列番号：9、配列番号：10に示したとおりであった。決定した塩基配列から予想される前記ハイブリドーマが産生する1-3-1抗体の重鎖及び軽鎖の可変領域のアミノ酸配列は、夫々、配列番号：11及び配列番号：12で示す通りである。このアミノ酸配列及び塩基配列が明らかにされたDNA断片は、上述の様な方法を繰り返すことなく、DNA合成機により再現性よく取得することができる。

【0053】 実施例7

(アドリアマイシン含有GAH抗体結合リボソームの作製)

a. チオール化抗体の作製

抗腫瘍細胞反応性GAH抗体(IgG)を0.1M酢酸緩衝液(pH4.0)で1/40mol量のペプシン[Cooper Biomedical社製]を加え、37℃で一夜反応させてF(ab')₂化し、陽イオン交換樹脂(mono S)[ファルマシア社製]によるクロマト分離によってF(ab')₂を単離した。分離条件は、0.1M酢酸緩衝液(pH4.0)中、0から0.5M NaClを含有する同緩衝液の直線勾配により行った。単離されたF(ab')₂を0.15M NaClを含む0.1M酢酸緩衝液(pH4.5)中で、抗体1mgにつき10%DTT 12μlを加え、室温で80分間放置した。反応終了後、PBSに平衡化したゲルろ過カラム(PD-10)で脱塩し、チオール化F(ab')₂抗体を調製した。

【0054】 b. チオール化ポリエチレングリコールの作製

L-シスチン48mgを0.4Mほう酸緩衝液10mlに溶解し、2,4-ビス(ポリエチレングリコール)-6-クロロ-s-トリアジン(活性化PEG2)[生化学工業社製]200mgを加え室温で一夜反応した。得られたシスチン結合PEGにDTT 62mgを加え37℃で6時間反応させることでシスチン結合PEGを含む溶液を得た。さらに反応液をゲル濾過(GH-25 生化学工業)等で脱塩し10mMリン酸緩衝液(pH7.4)、0.15M-NaCl(PBS)に置換した後PBSで平衡化したチオプロピルセファロース6B(ファルマシア)7mlに添加し、非結合物をPBSで洗浄除去した。ゲルに結合したシスチン結合PEGを、50mM-DTTを含むPBSで溶出後、ゲル濾過

等で余剰のDTTを脱塩除去し標品(チオール化PEG)を得た。

【0055】 c. マレイミド化ジバルミトイルフォスファチジルエタノールアミンの作製

ジバルミトイルフォスファチジルエタノールアミン127mg、N-(ε-マレイミドカプロイルオキシ)スクシンイミド(EMCS)80mg、トリエチルアミン44μlをクロロホルム/メタノール：5/1の溶液に加え、窒素気流下で3時間反応させた。その後、さらに20mgのEMCSを追加しさらに室温で3時間反応させた。反応溶液のニンヒドリン反応が陰性になったことを確認後、減圧乾固し、少量のクロロホルムに再溶解した。マレイミド化ジバルミトイルフォスファチジルエタノールアミンはUNISIL[ガスクロ工業社製]を用いたクロマトグラフィーで精製した。クロロホルムで平衡化した同カラムに添加しクロロホルム/メタノール：10/1の溶離液で展開し目的物質を得た。

【0056】 d. マレイミド基含有アドリアマイシン封入リボソームの作製

DPPC(ジバルミトイルフォスファチジルコリン)/chol(コレステロール)/マレイミド化DPPE(ジバルミトイルフォスファチジルエタノールアミン)が、18/10/3(mol比)からなる固形脂質混合物(日本精化社製)100mgに0.4Mクエン酸緩衝液pH4を1ml加え攪はんし、さらに凍結融解を5回繰り返し水和することによりマルチラメラリボソームを作製した。ついでマルチラメラリボソームを200nmのボアサイズをもつポリカーボネート膜[ヌクレオボア、マイクロサイエンス社製]を装着した加圧装置(extruder; Lipex Biomembranes)で60℃に加温しつつ10回加圧濾過を繰り返すことで製粒されたりボソームを得た。このリボソーム溶液を1M NaOH溶液で中和し60℃に加温しつつ脂質重量の1/10重量のアドリアマイシン[協和発酵社製]を加えた。リボソーム内外のpH勾配に従って97%以上のアドリアマイシンが能動的にリボソームに封入され、マレイミド基含有アドリアマイシン封入リボソームが作製された。

【0057】 e. マレイミド基含有アドリアマイシン封入リボソームへのチオール化抗体の結合とPEG修飾 脂質100mgからなる上記マレイミド含有アドリアマイシン封入リボソームにチオール化F(ab')₂抗体、5mgを加え、37℃で8時間反応させ、さらに5μmolのチオール化PEGを加え、PBS中室温で6時間反応させることによりPEG修飾抗体結合アドリアマイシン封入リボソームを作製した。さらにセファロースCL6B(ファルマシア社製)でゲル濾過し未反応のシスチン結合PEGを分離した。

【0058】 試験例6

(アドリアマイシン封入GAH抗体結合PEG修飾リボ

ソームの薬効確認) GAH抗体の反応性が認められ、またヌードマウス移植系で集積性が認められるヒト胃癌細胞株MKN45を用い抗腫瘍効果を検討した。治療実験は培養したMKN45細胞 1×10^6 個をヌードマウス皮下に移植し、10日後、腫瘍重量が約100mgになった時点から開始した。結果を図5に示した。治療開始当日、3日および7日経過後にアドリアマイシン封入GAH抗体結合PEG修飾リボソームをアドリアマイシン換算で5mg/kg、尾静脈投与した(図中、◇で表示)。また、コントロール群としてリン酸緩衝生理食塩水(図中、◆で表示)、アドリアマイシン単独(図中、□で表示)、アドリアマイシン封入PEG修飾リボソーム(図中、×で表示)投与群(各群6~7匹)を設けた。その腫瘍増殖の経時変化を測定するため、バツェル-コロンバス法に従って腫瘍の短径×短径×長径/2の計算式で推定腫瘍重量を求め、その推移を治療開始時点での腫瘍重量を基準として示した。横軸は治療実験開始*

配列

G GCC CTT GGT GGA GGC TGA AGA GAC GGT GAC CAT TCT 37

【0061】配列番号: 2

配列の長さ: 21

配列の型: 核酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA

起源

ヒトIgG抗体

配列

配列

CAG GTG CAG CTG CAG GAG TCG GGC CCA GGA CTG GTG AAG CCT TCA 45
 CAG ACC CTG TCC CTC ACC TGC ACT GTC TCT GGT GGC TCC ATC AGC 90
 AGT TGT GGT TTC TAC TGG AAC TGG ATC CGC CAG CAC CCA GGG AAG 135
 GGC CTG GAG TGG ATT GGG TAC ATC TAT TAC AGT GGG AGC ACC TAC 180
 TAC AAC CCG TCC CTC AAG AGT CGA GTT ACC ATA TCG CTA GAC ACG 225
 TCT AAG AGC CAG TTC TCC CTG AAG CTG AGC TCT CTG ACT GCC GCG 270
 GAC ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGG TCT ACC CGA CTA CGG GGG 315
 GCT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACA ATG GTC ACC GTC TCT TCA 357

【0063】配列番号: 4

配列の長さ: 342

配列の型: 核酸

トポロジー: 直鎖状

配列

GAC ATC GTG ATG ACC CAG TCT CCA GAC TCC CTG GCT GTG TCT CTG 45
 GGC GAG AGG GCC ACC ATC AAC TGC AAG TCC AGC CAG AGT GTT TTA 90
 TAC AAC TCC AAC AAT AAG AAA TAC TTA GCT TGG TAC CAG CAG AAA 135
 CCA GGA CAG CCT CCT AAG CTG CTC ATT TAC TGG GCA TCT ACC CGG 180
 GAA TCC GGG GTC CCT GAC CGA TTC AGT GGC AGC GGG TCT GGG ACA 225
 GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG GCT GAA GAT GTG GCA 270
 GTT TAT TAC TGT CAG CAG TAT TAT AGT ACT CCG TGG ACG TTC GGC 315
 CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA CGA 342

【0064】配列番号: 5

50 配列の長さ: 119

*後の経過日数を示す。図中(↓)は薬剤投与日を示す。
 これよりアドリアマイシン封入モノクローナル抗体結合PEG修飾リボソームの強い抗腫瘍効果が示された。

【0059】

【発明の効果】本発明で得られたヒト型モノクローナル抗体を用いることにより、癌組織に対する抗癌剤、毒素等のターゲッティング治療が可能である。また、本発明の抗腫瘍剤は、ヒト型モノクローナル抗体を含むので、癌組織に特異的であり、連続投与が可能である。

【0060】

【配列表】配列番号: 1

配列の長さ: 37

配列の型: 核酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA

起源

ヒトIgG抗体

20*TTG TGC AGC CAC AGT TCG TTT

21

【0062】配列番号: 3

配列の長さ: 357

配列の型: 核酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA

起源

※ 細胞の種類: ヒト抗体GAH産生ハイブリドーマ細胞

★配列の種類: cDNA

起源

細胞の種類: ヒト抗体GAH産生ハイブリドーマ細胞

★40

配列の型：アミノ酸
トポロジー：直鎖状
配列の種類：タンパク質

* 起源
細胞の種類：ヒト抗体GAH産生ハイブリドーマ細胞

*

配列

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser
1				5					10					15
Gln	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Gly	Ser	Ile	Ser
				20					25					30
Ser	Cys	Gly	Phe	Tyr	Trp	Asn	Trp	Ile	Arg	Gln	His	Pro	Gly	Lys
				35					40					45
Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Tyr	Ile	Tyr	Tyr	Ser	Gly	Ser	Thr	Tyr
				50					55					60
Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu	Lys	Ser	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Leu	Asp	Thr
				65					70					75
Ser	Lys	Ser	Gln	Phe	Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ala	Ala
				80					85					90
Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Ser	Thr	Arg	Leu	Arg	Gly
				95					100					105
Ala	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Met	Val	Thr	Val	Ser	Ser	
				110					115				119	

【0065】配列番号：6

配列の長さ：114

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

※配列の種類：タンパク質

起源

細胞の種類：ヒト抗体GAH産生ハイブリドーマ細胞

※

配列

Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Asp	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Leu
1				5					10					15
Gly	Glu	Arg	Ala	Thr	Ile	Asn	Cys	Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Val	Leu
				20					25					30
Tyr	Asn	Ser	Asn	Asn	Lys	Lys	Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys
				35					40					45
Pro	Gly	Gln	Pro	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Trp	Ala	Ser	Thr	Arg
				50					55					60
Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr
				65					70					75
Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Ala	Glu	Asp	Val	Ala
				80					85					90
Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Tyr	Ser	Thr	Pro	Trp	Thr	Phe	Gly
				95					100					105
Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg						
				110					114					

【0066】配列番号：7

配列の長さ：17

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

起源

ヒトIgM抗体

配列

C GAG GGG GAA AAG GGT T

【0067】配列番号：8

配列の長さ：19

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

起源

ヒトIgM抗体

配列G AAG CTC CTC AGA GGA GCG

【0068】配列番号：9

配列の長さ : 3 6 6

配列の型: 核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類： cDNA

* 起源

細胞の種類：ヒト抗体1-3-1産生ハイブリドーマ細胞

*

配列

CAG CTG CAG CTG CAG GAG TCG GGC CCA GGA CTG GTG AAG CCT TCG	45
GAG ACC CTG TCC CTC ACC TGC ACT GTC TCT GGT GGC TCC ATC AGC	90
AGT AGT AGT TAC TAC TGG GGC TGG ATC CGC CAG CCC CCA GGG AAG	135
GGG CTG GAG TGG ATT GGG AGT ATC TAT TAT AGT GGG AGC ACC TAC	180
TAC AAC CCG TCC CTC AAG AGT CGA GTC ACC ATA TCC GTA GAC ACG	225
TCC AAG AAC CAG TTC TCC CTG AAG CTG AGC TCT GTG ACC GCC GCA	270
GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGG GGG AGC TAC GGG GGC TAC	315
TAC TAC GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC	360
TCC TCA	366

【0069】配列番号: 10

配列の長さ : 3 2 4

配列の型: 核酸

トポロジー：直鎖状

※配列の種類：cDNA

起源

細胞の種類: ヒト抗体1-3-1産生ハイブリドーマ細胞

※ 胞

配列

TAT GAG CTG ACA CAG CCA CCC TCG GTG TCA GTG TCC CCA GGA CAG	45
ACG GCC AGG ATC ACC TGC TCT GGA GAT GCA TTG CCA AAG CAA TAT	90
GCT TAT TGG TAC CAG CAG AAG CCA GGC CAG GCC OCT GTG CTG GTG	135
ATA TAT AAA GAC AGT GAG AGG CCC TCA GGG ATC OCT GAG CGA TTC	180
TCT GGC TCC AGC TCA GGG ACA ACA GTC ACG TTG ACC ATC AGT GGA	225
GTG CAG GCA GAA GAC GAG GCT GAC TAT TAC TGT CAA TCA GCA GAC	270
AGC AGT GGT ACT TAT GAG GTA TTC GGC GGA GGG ACC AAG CTG ACC	315
GTG CTA GGT	324

【0070】配列番号：11

配列の長さ: 1 2 2

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

★配列の種類：タンパク質

起源

30 細胞の種類: ヒト抗体1-3-1産生ハイブリドーマ細胞

★ 胞

配列

Gln	Leu	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser
1				5					10					15
Glu	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Gly	Ser	Ile	Ser
				20					25					30
Ser	Ser	Ser	Tyr	Tyr	Trp	Gly	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys
				35					40					45
Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Ser	Ile	Tyr	Tyr	Ser	Gly	Ser	Thr	Tyr
				50					55					60
Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu	Lys	Ser	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Thr
				65					70					75
Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala
				80					85					90
Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Gly	Ser	Tyr	Gly	Gly	Tyr
				95					100					105
Tyr	Tyr	Gly	Met	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val
				110					115					120

Ser Ser

27

28

【0071】配列番号: 12

配列の長さ: 108

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

* 配列の種類: タンパク質

起源

細胞の種類: ヒト抗体1-3-1産生ハイブリドーマ細胞

* 胞

配列

Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Gln Tyr
 20 25 30
 Ala Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val
 35 40 45
 Ile Tyr Lys Asp Ser Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Ser Ser Gly Thr Thr Val Thr Leu Thr Ile Ser Gly
 65 70 75
 Val Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Ala Asp
 80 85 90
 Ser Ser Gly Thr Tyr Glu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr
 95 100 105
 Val Leu Gly
 108

【0072】配列番号: 13

配列の長さ: 8

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

※配列の種類: タンパク質

起源

細胞の種類: 癌細胞の膜表面にその抗原を持つヒト型モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞

※

配列

Ile Ser Ser Xaa Xab Xac Tyr Trp
 1 5

Xaa: Cys or Ser, Xab: Gly or Ser, Xac: Phe or Tyr

【0073】配列番号: 14

配列の長さ: 12

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: タンパク質

起源

細胞の種類: 癌細胞の膜表面にその抗原を持つヒト型モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞

30

配列

Gly Xaa Asp Xab
 1

Xaa: Ala or Met, Xab: Tyr or Val

配列

Ile Gly Xaa Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr
 1 5 10

Xaa: Tyr or Ser,

【0074】配列番号: 15

配列の長さ: 4

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: タンパク質

起源

細胞の種類: 癌細胞の膜表面にその抗原を持つヒト型モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞

40 細胞の種類: ヒト抗体GAH産生ハイブリドーマ細胞

配列

Ile Ser Ser Cys Gly Phe Tyr Trp Asn
 1 5

【0076】配列番号: 17

配列の長さ: 12

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: タンパク質

起源

50 細胞の種類: ヒト抗体GAH産生ハイブリドーマ細胞

29

30

配列

Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr
1 5 10

【0077】配列番号：18

配列の長さ：9

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

起源

細胞の種類：ヒト抗体GAH産生ハイブリドーマ細胞 *10

*

配列

Ser Thr Arg Leu Arg Gly Ala Asp Tyr
1 5

【0078】配列番号：19

配列の長さ：17

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

起源

細胞の種類：ヒト抗体GAH産生ハイブリドーマ細胞

配列

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Asn Ser Asn Asn Lys Lys Tyr Leu Ala
1 5 10 15

【0079】配列番号：20

配列の長さ：7

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

起源

細胞の種類：ヒト抗体GAH産生ハイブリドーマ細胞

※配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

起源

細胞の種類：ヒト抗体1-3-1産生ハイブリドーマ細胞
20 胞

配列

Trp Ala Ser Thr Arg Gln Ser
1 5

【0080】配列番号：21

配列の長さ：9

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

起源

細胞の種類：ヒト抗体GAH産生ハイブリドーマ細胞

配列

Ile Ser Ser Ser Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp
1 5 10

【0082】配列番号：23

配列の長さ：14

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

起源

細胞の種類：ヒト抗体1-3-1産生ハイブリドーマ細胞
30 胞

配列

Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Trp Thr
1 5

【0081】配列番号：22

配列の長さ：10

※

配列

Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro
1 5 10

【0083】配列番号：24

配列の長さ：12

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

起源

細胞の種類：ヒト抗体1-3-1産生ハイブリドーマ細胞
胞

配列

Gly Ser Tyr Gly Gly Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10

【0084】配列番号：25

配列の長さ：9

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

起源

細胞の種類：ヒト抗体1-3-1産生ハイブリドーマ細胞
50 胞

31

配列

Asp Ala Leu Pro Lys Gln Tyr Ala Tyr
1 5

【0085】配列番号：26

配列の長さ：4

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

起源

細胞の種類：ヒト抗体1-3-1産生ハイブリドーマ細胞

配列

Lys Asp Ser Glu
1

【0086】配列番号：27

配列の長さ：11

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

起源

細胞の種類：ヒト抗体1-3-1産生ハイブリドーマ細胞

配列

ATT GGG WRY ATC TAT TAY AGT GGG AGC ACC TAC TAC 36

W : T or A, R : A or G, Y : C or T

【0089】配列番号：30

配列の長さ：12

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列

GGK RYK GAC KWC 12

K : G or T, R : G or A, Y : C or T

W : A or T

【0090】配列番号：31

配列の長さ：27

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

起源

細胞の種類：ヒト抗体GAH産生ハイブリドーマ細胞

配列

配列

ATT GGG TAC ATC TAT TAC AGT GGG AGC ACC TAC TAC 36

【0092】配列番号：33

配列の長さ：27

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

*

配列

Gln Ser Ala Asp Ser Ser Gly Thr Tyr Glu Val
1 5 10

【0087】配列番号：28

配列の長さ：24

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

起源

細胞の種類：癌細胞の膜表面にその抗原を持つヒト型モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞

配列

ATC AGC AGT WGT RGT TWC TAC TGG 28
W : T or A, R : G or A

【0088】配列番号：29

配列の長さ：36

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

20

起源

細胞の種類：癌細胞の膜表面にその抗原を持つヒト型モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞

*

※配列の種類：cDNA

起源

30

細胞の種類：癌細胞の膜表面にその抗原を持つヒト型モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞

※

★ATC AGC AGT TGT GGT TTC TAC TGG 27

【0091】配列番号：32

配列の長さ：36

配列の型：核酸

40

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

起源

★

細胞の種類：ヒト抗体GAH産生ハイブリドーマ細胞

配列

ATT GGG TAC ATC TAT TAC AGT GGG AGC ACC TAC TAC 36

【0092】配列番号：33

配列の長さ：27

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

起源

細胞の種類：ヒト抗体GAH産生ハイブリドーマ細胞

配列

TCT ACC CGA CTA CGG GGG GCT GAC TAC 27

50

【0093】配列番号：34

配列の長さ: 51

配列の型: 核酸

トポロジー: 直鎖状

配列

AAG TCC AGC CAG AGT GTT TTA TAC AAC TCC AAC AAT AAG AAA TAC TTA GCT 51

【0094】配列番号: 35

配列の長さ: 21

配列の型: 核酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA

起源

細胞の種類: ヒト抗体GAH産生ハイブリドーマ細胞

配列

TGG GCA TCT ACC CGG GAA TCC 21

【0095】配列番号: 36

配列の長さ: 27

配列の型: 核酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA

起源

細胞の種類: ヒト抗体GAH産生ハイブリドーマ細胞

配列

CAG CAG TAT TAT AGT ACT CCG TGG ACG 27

配列

ATT GGG AGT ATC TAT TAT AGT GGG AGC ACC TAC TAC AAC CCG 42

【0098】配列番号: 39

配列の長さ: 36

配列の型: 核酸

トポロジー: 直鎖状

配列

GGG AGC TAC GGG GGC TAC TAC TAC GGT ATG GAC GTC 36

【0099】配列番号: 40

配列の長さ: 27

配列の型: 核酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA

起源

細胞の種類: ヒト抗体1-3-1産生ハイブリドーマ細胞

配列GAT GCA TTG CCA AAG CAA TAT GCT TAT 27

【0100】配列番号: 41

配列の長さ: 12

配列の型: 核酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA

配列

CAA TCA GCA GAC AGC AGT GGT ACT TAT GAG GTA 33

【図面の簡単な説明】

【図1】ベクターpKCRDの構築の概略図を示す。

【図2】ベクターpKCR(ΔE)/Hの構築の概略図を示す。

* 配列の種類: cDNA

起源

* 細胞の種類: ヒト抗体GAH産生ハイブリドーマ細胞

※【0096】配列番号: 37

配列の長さ: 30

配列の型: 核酸

トポロジー: 直鎖状

10 配列の種類: cDNA

起源

細胞の種類: ヒト抗体1-3-1産生ハイブリドーマ細胞

配列

ATC AGC AGT AGT AGT TAC TAC TGG GGC TGG 30

【0097】

配列番号: 38 配列の長さ: 42

配列の型: 核酸

トポロジー: 直鎖状

20 配列の種類: cDNA

起源

細胞の種類: ヒト抗体1-3-1産生ハイブリドーマ細胞

※ 胞

★配列の種類: cDNA

起源

細胞の種類: ヒト抗体1-3-1産生ハイブリドーマ細胞

★ 胞

☆起源

細胞の種類: ヒト抗体1-3-1産生ハイブリドーマ細胞

配列

AAA GAC AGT GAG 12

【0101】配列番号: 42

配列の長さ: 33

配列の型: 核酸

40 トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA

起源

細胞の種類: ヒト抗体1-3-1産生ハイブリドーマ細胞

☆ 胞

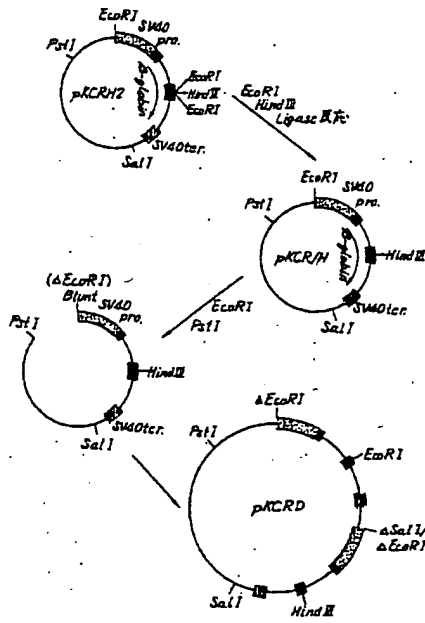
【図3】1-3-1抗体の大腸癌細胞株C1に対する反応性を示す。

【図4】1-3-1抗体の胃癌細胞株MKN45に対する反応性を示す。

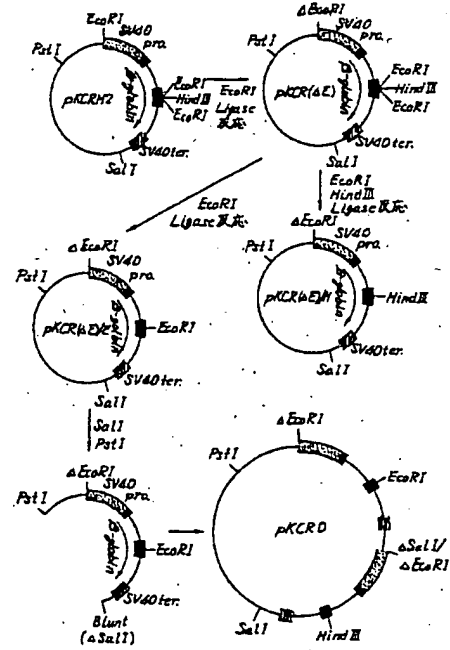
50

【図5】ヌードマウス移植癌に対するアドリマイシン
封入GAH抗体結合PEG修飾リボソームの抗腫瘍効果

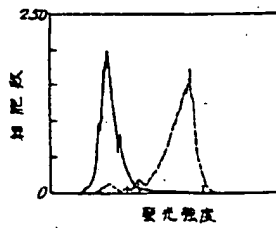
【図1】



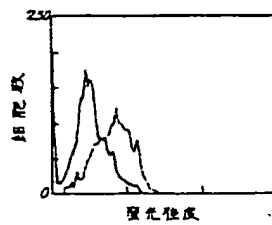
【図2】



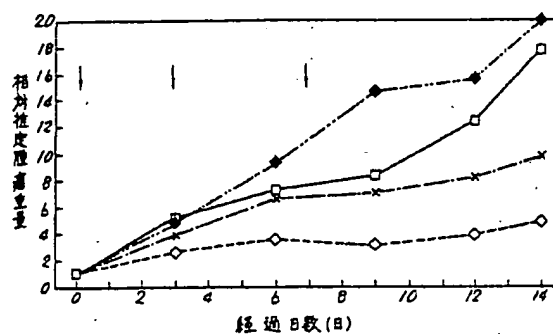
【図3】



【図4】



【図5】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

FI

技術表示箇所

C 1 2 N 15/13

ZNA

// A 6 1 B 10/00

T

C 1 2 N 15/08

G 0 1 N 33/577

B 9015-2J

(C 1 2 P 21/08

C 1 2 R 1:91)

8931-4B

C 1 2 N 15/00

C

(72)発明者 伊藤 典彦

神奈川県横浜市緑区鴨志田町1000番地 三

菱化成株式会社総合研究所内

(72)発明者 長池 一博

神奈川県横浜市緑区鴨志田町1000番地 三

菱化成株式会社総合研究所内



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



Publication number: 0 520 499 A1

12

EUROPEAN PATENT APPLICATION

21 Application number: 92110841.1

22 Date of filing: 26.06.92

51 Int. Cl.⁵: C07K 15/28, C07H 21/04,
C12N 5/28, A61K 39/44,
C12P 21/08

30 Priority: 28.06.91 JP 158859/91
28.06.91 JP 158860/91
28.06.91 JP 158861/91

43 Date of publication of application:
30.12.92 Bulletin 92/53

64 Designated Contracting States:
AT BE CH DE DK ES FR GB GR IT LI LU MC
NL PT SE

71 Applicant: MITSUBISHI KASEI CORPORATION
5-2, Marunouchi 1-chome Chiyoda-ku
Tokyo(JP)

72 Inventor: Hosokawa, Salko
1458-25, Okagami, Aso-ku
Kawasaki-shi, Kanagawa-ken(JP)
Inventor: Tagawa, Toshiaki
3-A102, Sakuradal, Midori-ku
Yokohama-shi, Kanagawa-ken(JP)
Inventor: Hirakawa, Yoko
1-23-1-203, Ursukushigaoka, Midori-ku
Yokohama-shi, Kanagawa-ken(JP)
Inventor: Ito, Norihiko
23-4, Tana-cho, Midori-ku
Yokohama-shi, Kanagawa-ken(JP)
Inventor: Nagaïke, Kazuhiro
5-7, Sakae-cho, Sagami-hara-shi
Kanagawa-ken(JP)

74 Representative: Hansen, Bernd, Dr.
Dipl.-Chem. et al
Hoffmann, Eitle & Partner Patent- und
Rechtsanwälte Arabellastrasse 4 Postfach
81 04 20
W-8000 München 81(DE)

54 Human monoclonal antibody specifically binding to surface antigen of cancer cell membrane.

EP 0 520 499 A1

57 A human monoclonal antibody specifically binding to a surface antigen of cancer cell membrane, an isolated DNA encoding the antibody, and a hybridoma producing the antibody. An anti-cancer formulation comprising the monoclonal antibody bonded to the surface of a liposome enclosing an anti-cancer agent or toxin is also provided.

The present invention relates to a novel human monoclonal antibody useful for diagnosis and therapy of cancer, an isolated DNA encoding the monoclonal antibody, and a hybridoma producing the antibody. The present invention also relates to an anti-cancer formulation comprising the antibody bonded to a liposome which contains an anti-cancer agent.

5 There has been no anti-cancer formulation thus far, which is sufficiently effective for the treatment of solid cancer. On the other hand, there has long existed an idea called "targeting" in which a therapeutical agent is concentrated at a tissue or an organ to be treated in order to maximize the therapeutical effect of the agent. Accordingly, it has been expected that focusing an anti-cancer agent at a cancer tissue by means of "targeting" may allow a therapy of the solid cancer. A number of trials to concentrate an anti-
10 cancer agent or a toxin at a cancer tissue were made since a method for production of mouse monoclonal antibodies in large quantities has been established by Milstein and Köhler (Nature, 1975), and some of them were successful.

Thus far, binding of an antibody to a therapeutic agent has been accomplished by directly binding an antibody to a chemically-modified therapeutic agent, or indirectly binding them via a water-soluble polymer
15 such as dextran. These methods, however, have drawbacks that the amount of a therapeutic agent capable of binding to one antibody molecule is very limited, and that chemical modification of a therapeutic agent often causes lowering of the therapeutical activity. As one of the countermeasures to overcome the drawbacks, there was proposed a new delivery system which consists of an antibody bonded to the surface of a liposome in which a therapeutic agent is encapsuled, and many favorable results were reported (Konno
20 et al. Cancer Research 47 4471, 1987; Hashimoto et al. Japanese Patent Publication (unexamined) No. 134032/1983).

However, mouse monoclonal antibodies have a limited clinical use and continued administration thereof is impossible from a practical point of view due to side effects such as anaphylaxis caused by immune response (See A. Lo Bugli et al, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 86 4220, 1989). Accordingly, human
25 monoclonal antibodies rather than mouse monoclonal antibodies are preferable for the purpose of clinical use. However, preparation of human monoclonal antibodies which adequately react with cancer cells has long been considered very difficult because of the reasons that it is very difficult to conduct passive immunity for the purpose of obtaining human B cells which produce a desired antibody, and that any efficient methodology which allows infinite reproduction of antibody-producing cells has not been estab-
30 lished yet.

In such a situation as mentioned above, the inventors of the present invention have made extensive study for the purpose of obtaining a human monoclonal antibody which permits "targeting therapy" on cancer tissue or organ with the help of anti-cancer agents or toxins, and they have succeeded in preparing a hybridoma capable of producing a novel human monoclonal antibody, the antigen to which exists on the
35 surface of cell membrane of cancer cells. They also have succeeded in preparing a therapeutical formulation useful for "targeting therapy" of cancer, by binding the monoclonal antibody of the invention to a liposome in which an anti-cancer agent is encapsuled. The present invention is based on these findings.

Thus, the present invention provides a human monoclonal antibody specific to an antigen existing on the surface of a cancer cell membrane, said monoclonal antibody being produced by a fused cell between
40 a lymphocyte derived from cancer patient and a mouse myeloma cell. The invention further provides an isolated gene encoding the antibody, a hybridoma producing the antibody, and an anti-cancer formulation containing the antibody.

The human monoclonal antibodies of the present invention contain, in the variable region of the heavy chain, the amino acid sequences shown, for instance, in Sequence Listing Nos. 13, 14, and 15. More
45 specifically, the monoclonal antibodies of the invention include, among others, those in which the variable region of the heavy chain comprises the amino acid sequences shown in Sequence Listing Nos. 16, 17, and 18, and the variable region of the light chain comprises the amino acid sequences shown in Sequence Listing Nos. 19, 20, and 21, and those in which the variable region of the heavy chain comprises the amino acid sequences given in Sequence Listing Nos. 22, 23, and 24, and the variable region of the light chain
50 comprises the amino acid sequences given in Sequence Listing Nos. 25, 26, and 27.

The monoclonal antibodies of the invention include any variants of the above-mentioned specific antibodies, which are obtainable by making insertion, deletion, substitution and/or addition of one or more amino acid residues to the amino acid sequences of the above-identified antibodies with the limitations that such modification must not adversely affect the reactivity of the antibodies against the antigens. The
55 present invention will be more detailed below.

In the accompanying drawings:

Fig. 1 schematically shows the construction of vector pKCRD.

Fig. 2 schematically shows the construction of vector pKCR(Δ E)/H.

Fig. 3 shows reactivity of antibody 1-3-1 to colon cancer cell line C-1.

Fig. 4 shows reactivity of antibody 1-3-1 to gastric cancer cell line MKN45.

Fig. 5 shows anti-cancer effects of adriamycin-containing and PEG-modified liposome bonded to antibody GAH on the cancer transplanted to nude mouse.

5 The hybridoma producing a human monoclonal antibody of the invention is prepared according to the method described by A. Imam (Cancer Research 45 263, 1985). Thus, lymphocytes which have been isolated from extracted lymph node associated with cancer are fused with mouse myeloma cells in the presence of polyethylene glycol. Hybridomas thus obtained are screened by means of enzyme immunoassay using various cancer cell line fixed with paraformaldehyde, and hybridomas capable of producing
10 antibodies are obtained and cultured. From supernatant of the resulting culture, monoclonal antibodies are isolated and purified according to a conventional method such as disclosed by R. C. Duhamel (J. Immunol. Methods 31 211, 1979).

The purified monoclonal antibody is labelled with a fluorescent substance and examined about its reactivity with living cancer cells and normal cells such as erythrocytes and leucocytes using Flow
15 Cytometry. Hybridoma producing an antibody which reacts with the living cells but not with normal cells are selected. Alternatively, the reactivity of antibodies to cancer cells isolated from cancer tissue of a patient is compared with the reactivity to normal cells derived from non-cancer segment of the same organ, and a hybridoma producing an antibody which reacts with the cancer cell and does not react, or reacts as moderately as an antibody derived from normal volunteer, with normal cells, is selected.

20 A base sequence of a DNA encoding a human monoclonal antibody produced by the hybridoma selected above can be determined in the following manner.

In accordance with Casara et al method (DNA 2 329, 1983), mRNAs are separated from the antibody-producing hybridoma cells, using guanidine thiocyanate-lithium chloride, and cDNA library is prepared by the use of oligo (dT) primer. The cDNAs thus obtained are then subjected to (dG) tailing. Consensus
25 sequence between poly C capable of hybridizing with the dG tail obtained above and an already available human gene encoding heavy or light chain of human antibodies is used as a probe for amplification of the antibody-encoding cDNA by means of PCR. The terminal of the amplified DNA is made blunt. The DNA separated from an electrophoresis gel is inserted to a cloning vector such as pUC119, and the base sequence of the DNA is determined by Sanger et al dideoxy method (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74 5463, 1977).
30

Preferable antibodies of the present invention are those in which the variable region of the heavy chain comprises the amino acid sequences shown in Sequence Listing Nos. 13, 14, and 15. Specific examples of preferred antibodies are, among others, those in which the variable region of the heavy chain comprises the amino acid sequences shown in Sequence Listing Nos. 16, 17, and 18, and the variable region of the light
35 chain comprises the amino acid sequences shown in Sequence Listing Nos. 19, 20, and 21, and those in which the variable region of the heavy chain comprises the amino acid sequences shown in Sequence Listing Nos. 22, 23, and 24, and the variable region of the light chain comprises the amino acid sequences shown in Sequence Listing Nos. 25, 26, and 27.

The above-noted amino acid sequences in Sequence Listing Nos. 13, 14, and 15; 16, 17, and 18; and
40 22, 23, and 24 are called "hyper variable region" in variable region of the heavy chain. Likewise, the amino acid sequences in Sequence Listing Nos. 19, 20, and 21; 25, 26, and 27 are called "hyper variable region" in variable region of the light chain. These regions are responsible for the specificity of the antibody and determinative to binding affinity between the antibody and the antigenic determinant. Accordingly, the variable region of the heavy chain in the antibodies of the invention can have various amino acid sequences
45 derived from different antibodies so far as it comprises the above-mentioned hyper variable regions.

The most preferred monoclonal antibodies of the invention are those in which the variable regions of the heavy and light chains are represented by the amino acid sequences of Sequence Listing Nos. 5 and 6 respectively, and also 11 and 12 respectively. The DNA sequences encoding constant regions of the heavy and light chains are the same as those disclosed in Nucleic Acids Research 14 1779, 1986. The Journal of
50 Biological Chemistry 257, 1516, 1982 and Cell 22, 197, 1980, respectively.

The monoclonal antibody of the invention may be prepared by culturing the hybridoma producing the antibody of the invention in eRDF or RPMI1640 medium containing fetal bovine serum. Alternatively, it may also be prepared by connecting the DNAs having the base sequences in Sequence Listing No. 3, 4, 9 and No. 10, which encode variable regions of heavy and light chains respectively, with known DNAs encoding
55 the constant regions as mentioned above to obtain a pair of genes encoding the monoclonal antibody of the invention, inserting the genes into one of various known expression vectors, transforming an appropriate host cell such as CHO cell with the expression vectors, and culturing the resultant transformant. As expression vectors to be used in animal cells, there may conveniently used a combination of pKCR (ΔE)/H

and pKCRD which may be constructed in the manner as shown in Figs. 1 and 2 starting from pKCRH2 disclosed by Mishina (Nature 307 605, 1984). In more detail, a gene encoding the heavy chain, to which a HindIII restriction site has been added, is inserted into plasmid pKCR ($\Delta E/H$) at the HindIII site, and a selective marker such as DHFR gene is inserted into the plasmid at Sall site. On the other hand, a gene encoding the light chain, to both ends of which EcoRI restriction site has been added, is inserted into plasmid pKCRD at EcoRI site, and then the DHFR gene is also inserted into the plasmid at Sall site. Both of the plasmids obtained above are incorporated into a host cell such as CHO dhfr⁻ (Urlaub G. & Chasin L. A., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 77 4216, 1980) by means of calcium phosphate method. The resultant transformant is cultured in α MEM medium containing no nucleotide, and grown cells are subjected to further selection for antibody-producing clones. The antibody of the invention can be obtained and purified by culturing the selected clone, adsorbing the resulting supernatant to a column filled with Protein A supported by cerulofine or agarose, and eluting the antibody from the column.

A liposome used for the preparation of the anti-cancer formulation of the invention is composed of two lipid layers. The lipid layer may be of monolayer or multiple layers. Constituents of the liposome are phosphatidylcholine, cholesterol, phosphatidylethanolamine, etc. Phosphatidic acid, which provides the liposome with electric charge, may also be added. The amounts of these constituents used for the production of the liposome are, for instance, 0.3-1 mol, preferably 0.4-0.6 mol of cholesterol, 0.01-0.2 mol, preferably 0.02-0.1 mol of phosphatidylethanolamine, 0.0-0.4 mol, preferably 0-0.15 mol of phosphatidic acid per 1 mol of phosphatidylcholine.

The liposome used in the present invention may be prepared by conventional methods. For example, a mixture of the above-mentioned lipids, from which the solvents have been removed, is emulsified by the use of a homogenizer, lyophilized, and melted to obtain multilamella liposome. Adjustment of particle size of the resultant liposomes may be conducted by ultrasonication, high-speed homogenization, or pressure filtration through a membrane having uniform pore size (Hope M. J. et al., Biochimica et Biophysica Acta 812 55, 1985). Preferable particle size of the liposomes are between 30nm and 200nm.

Anti-cancer agents encapsulated in the liposome includes carcinostatic agents such as adriamycin, daunomycin, mitomycin, cisplatin, vincristine, epirubicin, methotrexate, 5Fu, and aclacinomycin, toxins such as ricin A and diphtheria toxin, and antisense RNA. Encapsulation of anti-cancer agent into liposome is accomplished by hydration of the lipids with an aqueous solution of the anti-cancer agent. Adriamycin, daunomycin, and epirubicin may be encapsulated into a liposome by means of remote loading method taking advantage of pH gradient (Lawrence D.M. et al., Cancer Research 49 5922, 1989).

Binding of a monoclonal antibody to the surface of the liposome mentioned above may be accomplished by the formation of cross-linkage between phosphatidylethanolamine and the antibody using glutaraldehyde. However, preferred method is that a thiolated antibody is allowed to react with a liposome comprising a lipid into which a maleimide group has been incorporated. Remaining maleimide groups on the surface of the liposome may be further reacted with a compound containing thiolated polyalkyleneglycol moiety, thereby the surface of the liposome is modified.

Thiolation of an antibody may be conducted by the use of N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionate (SPDP), which is usually used for thiolation of protein, iminothiolane, or mercaptoalkylimide. Alternatively, a dithiol group intrinsic to an antibody may be reduced to form a thiol group. The latter is preferred from the view point of keeping antibody's function. Another method to provide an antibody with a thiol group is that an antibody is treated with an enzyme such as pepsin to form F(ab)₂, which is then reduced with dithiothreitol (DTT) to form Fab', which gives one to three thiol groups.

The binding of the thiolated antibody to the maleimide group-containing liposome may be accomplished by reacting them in a neutral buffer solution at pH 6.5-7.5 for 2-16 hours.

The anti-cancer formulation of the present invention may be prepared by means of conventional methods such as dehydration method (Japanese Patent Publication No. 502348/1990) and lyophilization method (Japanese Patent Publication No. 9331/1989).

The anti-cancer formulation of the invention may be administered intravascularly, peritoneally, or locally. Dosage of the formulation varies depending on the nature of particular anti-cancer agent encapsulated into the liposome. When the agent is adriamycin, the dosage is the one corresponding to adriamycin 50mg or less/kg body weight, preferably 10mg or less/kg, more preferably 5mg or less/kg.

The following detailed examples are presented by way of illustration of certain specific embodiments of the present invention.

Example 1

Establishment of Hybridoma Producing Human Monoclonal Antibody GAH

Hybridoma producing human monoclonal antibody GAH was established by cell fusion between lymphocytes derived from a lymph node associated with cancer tissue of a patient and mouse myeloma cells.

5 (1) Preparation of Lymphocytes

Cancer-associated lymph node extracted from a patient suffering from colon cancer was cut up into fine pieces with scissors and scalpel, and cells were dispersed using a stainless net in Culture Medium A (eRDF (Kyokuto Seiyaku Kogyo) + 50µg/ml gentamicin sulfate). The resultant cell suspension was centrifuged at
10 1000 rpm for 10 minutes and the supernatant was discarded. The residue was suspended in fresh Culture Medium A, and the suspension was centrifuged again to obtain 2.6×10^7 cells.

(2) Cell Fusion

15 The lymphocyte cells obtained above were subjected to cell fusion with mouse myeloma cells (1×10^7) in the presence of polyethyleneglycol (Boehringer-Mannheim) according to a conventional method. The fused cells were suspended into Culture Medium A added with 10µM hypoxanthine, 0.04µM aminopterin, 1.6µM thymidine, and 10% fetal calf serum (FCS), said medium being referred to as HAT addition medium hereinafter, so that the density of the lymphocytes may be 5.4×10^5 /ml. The suspension was plated on 96
20 well plates at 100µl/well and cultured at 37°C in a CO₂ incubator. Half of the culture medium was substituted with HAT addition medium from time to time and the cultivation was continued until hybridoma's colonies appeared. The hybridoma's colonies were observed in all of the wells. The supernatant of the culture in each well was tested on the reactivity to several established cancer cell lines such as colon cancer cell line C-1 (Sato et al, Igakunoayumi (Progress of Medicine) 96 876, 1976, obtained from Men Eki
25 Seibutsu Kenkyusho (Institute of Immunized Organisms)), and stomach cancer cell line MKN45 (Naito et al, Gan to Kagaku Ryoho (Cancer and Chemotherapy) 5 89, 1978, obtained from above-noted Institute) according to the method described in Experiment 1. Positive wells were 7.3% (35 wells) against C-1 and 4.6% (22 wells) against MKN45, and 6 wells showed positive reaction to both strains. Cloning of hybridomas was conducted using the wells which showed positive reaction to both lines. The cloning was conducted
30 three times by means of limiting dilution method, and hybridoma clone GAH was established.

Example 2

Purification and Labeling of Monoclonal Antibody GAH

35 (1) Culture of Hybridoma GAH and Purification of Monoclonal Antibody GAH

Fetal calf serum was passed through a Protein A-agarose (RepliGen), thereby substances adsorbed to the column was removed from the serum. For culture of hybridoma GAH, eRDF culture medium (Kyokuto
40 Seiyaku) to which 3% of the above serum had been added was used. The culture of hybridoma GAH was then charged into a Protein A-agarose column, and adsorbed antibody was then eluted out to obtain purified antibody. The use of the above-noted serum allowed to obtain pure antibody GAH free from other antibodies of serum origin and substances adsorbed to Protein A-agarose. The antibody GAH was confirmed to be a pure IgG by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis.

45 (2) Fluorescent Labeling of Antibody GAH

The purified antibody GAH was labeled by fluorescein isothiocyanate (FITC) according to the method of Coons A. H. Thus, the antibody was dialyzed against a carbonate buffer solution (pH9.5) and reacted with
50 FITC solution. The labeled antibody was separated from free FITC by gel filtration. Absorbance of fractions containing labeled antibody was measured at OD_{280nm} and OD_{495nm} and labeling degree was determined. The binding molar ratio of the antibody and FITC (F/P ratio) was 0.93.

Experiment 1

55 Study on Reactivity of Human Monoclonal Antibody against Cancer Cell Lines

(1) Cancer Cell Lines and Preservation Thereof

Colon cancer cell line C-1 and stomach cancer cell line MKN45 were used as human cancer cell lines. The cells were preserved and grown at 37°C under 5% CO₂ conditions using Culture Medium B (eRDF medium containing 10% FCS).

5 (2) Study on Reactivity to Cancer Cell Lines

a. Determination of reactivity against solid cancer cell lines

Cancer cells were cultured until monolayer in a 96 well plate for 3 or 4 days. After removal of culture supernatant, the plate was washed twice by 10mM phosphate buffer (pH7.4) and 0.15M NaCl solution (PBS), and 2% paraformaldehyde fixation was conducted at room temperature for 20 minutes. After washing 5 times with PBS, PBS solution containing 5% BSA (bovine serum albumin) was added to wells (200μl/well), and the plate was kept 37°C for 2 hours to complete blocking. The plate was washed 5 times with PBS, and 50μl of culture supernatant of hybridoma was added thereto. After two hour reaction at 37°C, the plate was washed 5 times with PBS and 50μl of alkaliphosphatase conjugated goat antibody to human antibody (1000 dilution, Capel) was added. Following one hour reaction at 37°C, the plate was washed 5 times with PBS and added with 0.05M carbonate buffer - 1mM MgCl (pH9.5) containing 25mM p-nitrophenyl phosphate at ratio of 50μl/well and allowed to react at room temperature for one hour to overnight. Absorbance at 405nm was measured with micro-plate photometer (Colona). Reactivity was determined according to the method described in Example 1 (2). Cloning from the wells in which positive reaction against cultured cancer cell lines C-1 and MKN45 has been observed gave hybridoma GAH. Purified antibody from culture supernatant of GAH showed the same reactivity.

b. Reactivity to living cancer cells

Cancer cells were cultured in a flask or Petri dish and culture supernatant was discarded. To the residue was added a PBS solution containing 0.02% EDTA, and the mixture was left to stand at room temperature for 30 minutes allowing the cells to float. The cells were washed with Culture Medium B by centrifugation and suspended in healthy human serum containing the fluorescent-labeled antibody GAH (final concentration: 50μg/ml) obtained in Example 2 (2) so that cell density of about 1×10^6 /200μl may be obtained, and the suspension was allowed to react at 0°C for 60 minutes. The suspension was centrifuged at 2000 rpm for 2 minutes and the supernatant was discarded. The remaining cells were suspended in 1ml of PBS, washed by centrifugation, and resuspended in 300μl of PBS containing 10μg/ml of propidium iodide (PI). The suspension was subjected to the observation by flow cytometer (FCM), FACS440 (Becton Dickinson), in order to determine the magnitude of fluorescence (FITC and PI) bonded to particular cell. Dead cells having PI fluorescence could be removed because the dead cells took in PI in the nucleic acids and emitted PI fluorescence. Markers having five standard amounts of fluorescence (quantitative kit: Ortho Diagnostic Systems) were subjected to FCM under the same conditioned as above. Based on the markers, average binding amount of FITC per cell was calculated. On the basis of the average binding amount and F/P ratio of labeled antibody, an average number of antibodies bonded to one living cell was determined. The results are shown in Table 1.

Table 1

Cancer Cell Strain	Antibody	
	GAH	Control IgG
MKN45	3.5×10^4	0.15×10^4
C-1	0.6×10^4	$<0.1 \times 10^4$

When compared with IgG derived from healthy human serum, which was labeled by fluorescence in the same manner as GAH and used as a control, about 6-23 times larger amount of antibody GAH has bonded to stomach and colon cancer cells.

Experiment 2

Reactivity of Human Monoclonal Antibody GAH to Blood Cells

Erythrocytes were separated from peripheral blood taken from 7 healthy volunteers and 3 patients suffering from cancer according to Kinoshita's method (Separation of Erythrocytes; New Edition of Nippon Ketsuekigaku Zensho 13 800, 1979).

Leukocytes were obtained in the following manner: Peripheral blood was drawn from healthy volunteers with addition of heparin. 2ml of 6% dextran-physiological saline was added and mixed to 10ml of the blood. The mixture was left to stand at room temperature for 50 minutes to give a plasma layer, which was then separated and centrifuged at 1500 rpm for 5 minutes to obtain leukocytes.

Reactivities of the monoclonal antibody of the invention to these blood cells were determined by means of FCM in the same manner as in the living cancer cells except that PI was not added. In this connection, the leukocytes were divided into lymphocyte (major leukocyte cell), granulocyte, monocyte, and platelet, based on front and side light scattering in FCM (Bio/Technology 3 337, 1985), and reactivities to respective cells were separately determined. The test results were shown in Table 2.

Table 2

Cells	Antibody	
	GAH	Control IgG
Leukocyte		
lymphocyte	negative	negative
granulocyte	0.49×10^4 *	0.48×10^4 *
monocyte	0.41×10^4 *	0.43×10^4 *
platelet	negative	negative
Erythrocyte	negative	negative

*: Average number of antibodies bonded per cell

Antibody GAH showed no reaction to erythrocyte and lymphocyte, while the reactivity to granulocyte and monocyte was the same level as the reactivity to control IgG likewise in Experiment 1.

Experiment 3

Reactivity of Human Monoclonal Antibody GAH to Cells Derived from Fresh Cancer Tissue and Non-Cancer Tissue

In order to study a binding specificity of antibody GAH to cancer cells, normal cells were simultaneously isolated from fresh tissue belonging to the same organ of the same patient from which cancer cells were obtained, and reactivities of antibody GAH to respective cells were determined. Isolation of cells from the tissue was conducted according to Tokita's method (Ganno Rinsho (Cancer in Clinic) 32 1803, 1986).

Thus, the tissue extracted was placed on Teflon sheet spreaded on a rubber plate, cut with a razor into fine pieces, and transferred onto a 1mm stainless meshes. The meshes was shaken in a Petri dish full of a culture medium to obtain the medium containing small cell aggregates which passed through the meshes. The medium was centrifuged at 1000 rpm, and floating fats and suspending necrotic debris were discarded. This centrifugation was repeated several times. The cell aggregates were subjected to pumping by means of a syringe with Cateran needle of 23 gauge to disperse the cells. The reactivity to the cells thus obtained was determined by FCM in the same manner as in the living cancer cells. The test results are shown in Table 3.

Table 3

Antibody	Colon		Stomach	
	Cancer Cells	Non-cancer Cells	Cancer Cells	Non-cancer Cells
GAH	1.1×10^4	0.03×10^4	180×10^4	4.6×10^4
Control IgG	0.15×10^4	0.04×10^4	3.5×10^4	0.9×10^4
Average number of antibodies bonded per cell				

The average number of GAH antibodies bonded to cancer cells is remarkably higher than that in the non-cancer cells. In addition, the number of antibodies bonded to cancer cells was 51 times greater than that in the control IgG in stomach cancer, and 7 times greater in colon cancer. These results indicate that antibody GAH recognizes an antigen dominantly expressed on the surface of cell membrane of cancer cells.

Examples 3

(1) Determination of Subclass of Light Chain of Monoclonal Antibody GAH

Antibody GAH obtained in Example 2 (1) was subjected to SDS-PAGE in the reduced form. Heavy chain and light chain separately electrophoresed were blotted on a transmembrane (Polyvinylidene-difluoride, Millipore). The membrane was blocked with 5% BSA solution and allowed to react with a goat antibody to human κ or λ chain, which was combined with peroxidase (Capel). After washing, a 0.05% (w/v) 4-chloronaphthol solution containing 0.015% H_2O_2 was allowed to react thereto as a substrate. The light chain of antibody GAH reacted with anti-human κ chain antibody, which was detected through the appearance of coloured band. This revealed that the light chain was κ chain.

(2) Preparation of Gene Encoding Monoclonal Antibody GAH

a. Preparation of cDNA encoding antibody GAH by means of polymerase chain reaction (PCR).

According to the method detailed below, poly(A)-containing RNAs were prepared from antibody GAH-producing hybridoma obtained in Example 1 (2) using guanidine thiocyanate-lithium chloride method (DNA 2 329, 1983).

The hybridoma cells (1×10^7) were solubilized in a solution (7.5ml) comprising 5M guanidine thiocyanate, 10mM EDTA, 50mM Tris-HCl, pH7.0, and 8% (v/v) β -mercaptoethanol. To the mixture was further added and mixed cesium chloride to the final concentration of 1g/2.5ml. The solution (8.0ml) was gently overlaid on a 5.7M cesium chloride solution (3.5ml) in a centrifuge tube, and centrifuged at 30,000 rpm for 23.5 hours using Hitachi RPS40T Rotary, which gave RNAs as a precipitate. The precipitate was dissolved in a solution (400 μ l) comprising 0.1% sodium lauryl sulfate, 1mM EDTA, and 10mM Tris-HCl, pH7.5, followed by phenol-chloroform extraction and ethanol precipitation. The resultant RNAs (about 64 μ g) was dissolved in a solution (40 μ l) comprising 10mM Tris-HCl, pH8.0, and 1mM EDTA. A 21 μ l aliquot of the solution provided about 2.64 μ g of mRNA containing poly(A) by means of mRNA Purification Kit (Pharmacia). The poly(A)-containing mRNA (1.1 μ g) was dissolved in water (10 μ l). To the solution were added oligo d(T) 12-18 primer (1.5 μ g) (Pharmacia), 10mM 4 dNTP (3 μ l) (Takara Shuzo), reverse transcriptase (40U) (Life Science), RNase inhibitor (30U) (Takara Shuzo), 5 \times reverse transcriptase buffer (6 μ l) comprising 250mM Tris-HCl, pH8.3, 40mM magnesium chloride, and 250mM potassium chloride, and additionally water to make a total volume of 30 μ l. The mixture was allowed to react at 41 °C for one hour, followed by ethanol precipitation to obtain cDNA.

The cDNA thus obtained was dissolved in water (15.3 μ l). To the solution were added a 5 \times terminal deoxynucleotide transferase buffer (4.8 μ l) (250mM Tris-HCl, pH7.5, 50mM magnesium chloride), terminal deoxynucleotide transferase (12U) (Pharmacia), and 10mM dGTP (2.4 μ l) (Takara Shuzo) to make a total volume of 24 μ l, and the mixture was allowed to react at 37 °C for 1.5 hours to add poly d(G) at 3' terminal of cDNA. After completion of the reaction, the enzymes were inactivated by heating at 70 °C for 15 minutes.

PCR was conducted based on the cDNA thus obtained as a template using Perkin Elmer Cetus DNA Thermal Cycler following the manual provided by the manufacturer. Thus, to the above reaction mixture (2 μ l) were added, as a primer for amplifying cDNA encoding variable region of the heavy chain, poly C (15

nucleotides) which hybridizes dG tail added to 3' terminal of the cDNA (40pmol), a single stranded DNA primer (37 nucleotides) corresponding to the region spanning from part of the variable region (113-119 amino acid sequence in Sequence Listing No. 5) to the constant region which is common to all human IgGs (25pmol) (Nucleic Acids Research 14 1779, 1986), poly C as a primer for amplifying cDNA encoding variable region of the light chain (40pmol), a single stranded DNA primer (21 nucleotides) corresponding to the region spanning from J region of human κ chain (113-114 amino acid sequence of Sequence Listing No. 6) to the constant region (The Journal of Biological Chemistry 257 1516, 1982; Cell 22 197, 1980) (40pmol), 10 x PCR buffer (100mM Tris-HCl, pH8.3, 500mM potassium chloride, 15mM magnesium chloride, 0.1% (w/v) gelatin (10 μ l), 10mM 4 dNTP (2 μ l) (Takara Shuzo), and Taq DNA polymerase (2.5U) (Takara Shuzo)), and further water to make a final volume of 100 μ l. Thirty cycles of incubations at 94°C for one minute (denaturing step) at 55°C for two minutes (annealing step) and at 72°C for three minutes (elongation step) were conducted and further incubation at 72°C for seven minutes was added. Reaction mixture was subjected to ethanol precipitation, and resultant precipitates were dissolved in water (30 μ l).

To the aqueous solution were added Klenow fragment (2U) (Takara Shuzo), 1mM 4 dNTP (4 μ l), and 10 x blunting buffer (500mM Tris-HCl, pH7.6, 100mM magnesium chloride) (4 μ l), 40 μ l in total, and the mixture was allowed to react at 37°C for 30 minutes to obtain a double-stranded cDNA having blunt ends.

b. Determination of base sequence of cDNA

The cDNA solution obtained above was subjected to 2% agarose electrophoresis, and a band was observed at about 500bp. The band was cut away from the agarose gel. The cDNA was inserted into a cloning vector pUC119 at SmaI site, and the base sequence was determined by dideoxy method, which revealed that among total base sequence of the PCR fragment, the base sequences encoding variable regions of the heavy and light chains were respectively those shown in Sequence Listing Nos. 3 and 4.

The amino acid sequences of variable regions of heavy and light chains of antibody GAH produced by the above-mentioned hybridoma were deduced from the base sequences determined above and are respectively shown in Sequence Listing Nos. 5 and 6. Based on the base sequences determined, antibody GAH was shown to belong to IgG1 subclass. The DNA fragment, the base sequence of which has been determined, can be prepared by means of DNA synthesizer with good reproducibility, and therefore, the acquisition of the DNA fragment does not require the repetition of the above procedure.

Example 4

Establishment of Human Monoclonal Antibody 1-3-1 Producing Hybridoma by Cell Fusion between Lymphocyte Derived from Cancer Associated Lymph Node and Mouse Myeloma

(1) Preparation of Lymphocyte

In substantial accordance with the procedure described in Example 1 (1), lymphocytes (3×10^7) were prepared starting from cancer associated lymph node extracted from a patient with lung cancer.

(2) Cell Fusion

Lymphocyte cells obtained above were fused with mouse myeloma cells (8×10^6) using polyethyleneglycol (Boehringer-Mannheim) according to the conventional method. In the same manner as Example 1 (2), the fused cells were suspended in HAT addition medium to obtain cell density of 5.2×10^5 /ml and placed on a 96 well plate at a ratio of 100 μ l/plate. Half of the culture medium was substituted with HAT addition medium from time to time and the culture was continued until hybridoma's colonies appeared. The hybridoma's colonies were observed in all of the wells. In the same manner as in Example 1 (2), the supernatant of the culture in each well was tested on the reactivity to fixed cancer cell lines such as colon cancer cell line C-1 and stomach cancer cell line MKN45, in accordance with the procedure described in Experiment 1 (2)-a. Positive wells were 16.3% (94 well) against C-1 and 6.3% (36 wells) against MKN45, and 4 wells showed positive reaction to both lines.

Cloning of hybridoma cells was conducted using the wells which showed positive reaction to both lines. The cloning was conducted three times by means of limiting dilution method, and hybridoma clone 1-3-1 was established.

Example 5

Purification and Labeling of Monoclonal Antibody 1-3-1

(1) Culture of Hybridoma 1-3-1 and Purification of Monoclonal Antibody 1-3-1

For culture of hybridoma 1-3-1, eRDF culture medium (Gokuto Seiyaku) to which 3% of the serum described in Example 2 (1) had been added was used. The culture of hybridoma 1-3-1 was then charged into a Protein A-agarose column, and adsorbed antibody was then eluted out to obtain purified antibody 1-3-1. The antibody was confirmed to be a pure IgM by SDS-PAGE.

10 (2) Fluorescent Labeling of Antibody 1-3-1

The purified antibody 1-3-1 was labeled by FITC according to the method described in Example 2 (2). Absorbance of fractions containing labeled antibody was measured at OD_{280nm} and OD_{495nm}, and labeling degree was determined. F/P ratio was 6.7.

15

Experiment 4

Study on Reactivity of Human Monoclonal Antibody to Cancer Cell Lines

20 (1) Cancer Cell Lines and Preservation thereof

Human colon cancer cell line C-1 and stomach cancer cell line MKN45 were preserved and grown at 37°C and 5% CO₂ conditions in Culture Medium B in the same manner as described in Experiment 1 (1).

25 (2) Study on Reactivity to Living Cancer Cell Lines

Cancer cells were cultured in a flask or Petri dish and culture supernatant was discarded. To the residue was added PBS solution containing 0.02% EDTA, and the mixture was left to stand at room temperature for 30 minutes allowing the cells to float. The cells were washed with Culture Medium B by centrifugation and suspended in PBS so as to make the cell density of about 1×10^6 /200 μ l. Antibody 1-3-1 obtained in Example 5 (1) was added to the above solution to make the final concentration of the antibody of 50 μ g/ml, and the mixture was allowed to react at 0°C for 60 minutes. The suspension was centrifuged at 2000 rpm for 2 minutes and the supernatant was discarded. To the remaining cells was added FITC labeled anti-human antibody solution (200 μ l) (Capel) diluted with 1% BSA-containing PBS by 500 times, and the resulting cell suspension was kept at 0°C for 60 minutes. The suspension was centrifuged at 2000 rpm for 2 minutes to remove the supernatant, and the remaining cells was suspended in and washed with PBS (1ml) by centrifugation, and the cells were finally suspended in PBS (300 μ l) containing PI (10 μ g/ml). The resultant cell suspension was subjected to FCM, and magnitude of fluorescence (FITC and PI) bonded to particular cell was determined. The reactivities of antibody 1-3-1 to colon cancer cell line C-1 and stomach cancer cell line MKN45 are respectively shown in Figs. 3 and 4 of the accompanying drawings. In the figures, the abscissa shows fluorescence intensity per cancer cell and the ordinate shows the number of the cancer cells. As a control, a commercially available IgM antibody (Capel) was used, and the reactivities of the IgM antibody to the above-identified cancer cells were determined. In the figures, the dotted line and solid line show the reactivities of antibody 1-3-1 and the control respectively. These figures show that antibody 1-3-1 has a strong binding ability to cancer cells.

Experiment 5

50 Reactivity of Human Monoclonal Antibody 1-3-1 to Cells Derived from Fresh Cancer Tissue and Non-Cancer Tissue

In order to study a binding specificity of antibody 1-3-1 to cancer cells, normal cells were simultaneously isolated from fresh tissue belonging to the same organ of the same patient, from which cancer cells were obtained, and reactivities of antibody 1-3-1 to respective cells were measured. Isolation of cells from the tissue was conducted according to Tokita's method as described in Experiment 3.

The reactivity to the cells obtained above was determined by FCM in the same manner as previously described in the living cancer cells. However, the cells were washed with Culture Medium B, suspended in serum derived from healthy volunteers, which serum contained fluorescent labeled antibody 1-3-1 (final

concentration of 50 μ g/ml) prepared in Example 5 (2), to the cell density of about 1×10^6 /200 μ l. The suspension was allowed to react at 0°C for 60 minutes and subjected to centrifugation at 2000 rpm for 2 minutes to remove the supernatant. The remaining cells were suspended in PBS (1ml) and washed by centrifugation. The cells were resuspended in PBS (300 μ l) containing PI (10 μ g/ml), and the suspension was subjected to FCM. The amount of fluorescent (FITC and PI) bonded to a particular cell was measured. Markers (5 species) for determining the amount of fluorescence (quantitative kit as previously prescribed) were subjected to FCM under the same condition. Average amount of FITC bonded to a single cell was calculated. Based on the average amount and F/P ratio of labeled antibody calculated in Example 5 (2), the average number of antibodies bonded to a living cancer cell was calculated. The results are shown in Table 4.

Table 4

Antibody	Colon		Stomach	
	Cancer Cells	Non-cancer Cells	Cancer Cells	Non-cancer Cells
1-3-1	1.5×10^4	0.04×10^4	1.8×10^3	0.05×10^3
Control	0.15×10^4	0.04×10^4	0.2×10^3	0.3×10^3

The reactivity of the human monoclonal antibody 1-3-1 to non-cancer cells was the same level as, or less than, that of the antibody which was derived from peripheral blood of healthy volunteers and fluorescent-labeled in the same manner as antibody 1-3-1, while the average number of antibodies bonded to cancer cells is remarkably higher than that in the non-cancer cells. In addition, the number of antibodies bonded to cancer cells was 10 times greater than that in the control antibody both in stomach and colon cancer. These results indicate that antibody 1-3-1 recognizes an antigen dominantly expressed on the surface of cell membrane of cancer cells.

Examples 6

(1) Determination of Subclass of Light Chain of Monoclonal Antibody 1-3-1

In order to determine the subclass of the light chain of antibody 1-3-1, the same procedure as described in Example 3 was repeated except that antibody 1-3-1 obtained in Example 5 (1) was used in place of antibody GAH. The light chain of antibody 1-3-1 reacted with anti-human λ chain antibody, which was detected through the appearance of coloured band. This revealed that the light chain was λ chain.

(2) Preparation of Gene Encoding Monoclonal Antibody 1-3-1 and Determination of Base Sequence

a. Preparation of cDNA encoding antibody 1-3-1 by means of PCR

According to the method detailed below, poly(A) containing RNAs were prepared from antibody 1-3-1 producing hybridoma obtained in Example 4 (2) using guanidine thiocyanate-lithium chloride method (DNA 2 329, 1983).

In the same manner as described in Example 3 except that the number of hybridoma cells used was 2×10^8 , the mRNA was prepared. The resultant RNAs (about 1.8mg) was dissolved in a solution (1ml) comprising 10mM Tris-HCl, pH8.0, and 1mM EDTA. A 230 μ l aliquot of the solution provided about 20 μ g of mRNA containing poly(A) after purification by means of mRNA Purification Kit (Pharmacia). Following the procedure described in Example 3, the poly(A)-containing mRNA (4.3 μ g) was dissolved in water (10 μ l), and to the solution were added oligo d(T) 12-18 primer (0.6 μ g), 10mM 4 dNTP (2 μ l), reverse transcriptase (40U), RNase inhibitor (30U), 5 \times reverse transcriptase buffer (6 μ l), and additionally water to make a total volume of 30 μ l. The mixture was allowed to react at 42°C for one hour, followed by ethanol precipitation to obtain cDNA.

The cDNA thus obtained was dissolved in water (20 μ l). To the solution were added a 5 \times terminal deoxynucleotide transferase buffer (5 μ l), terminal deoxynucleotide transferase (11U), and 10mM dGTP (2.5 μ l) to make a total volume of 25 μ l by adding water (6.5 μ l), and the mixture was allowed to react at 37°C for 1 hour to add poly d(G) at 3' terminal of cDNA. After completion of the reaction, the enzymes were inactivated by heating at 70°C for 10 minutes.

PCR was conducted using the cDNA thus obtained as a template. Thus, to the above reaction mixture (2.5 μ l) were added, as a primer for amplifying cDNA encoding variable region of the heavy chain, poly C (14 nucleotides) which hybridizes dG tail added to 3' terminal of the cDNA (25pmol), a single stranded DNA primer (17 nucleotides) corresponding to the base sequence of constant region of IgM shown in Sequence Listing No. 7 (25pmol) (Nucleic Acids Research 18 4278, 1990), poly C as a primer for amplifying cDNA encoding variable region of the light chain (25pmol), a single stranded DNA primer (19 nucleotides) (25pmol) corresponding to the base sequence of constant region of λ chain, shown in Sequence Listing No. 8 (Nature 294 536, 1981). The mixture was treated in the same manner as described in Example 3, which provided a double-stranded cDNA having blunt ends.

10

b. Determination of base sequence of cDNA

The cDNA solution obtained above was subjected to 2% agarose electrophoresis, and a band was observed at about 500bp. The band was cut away from the agarose gel. The cDNA was inserted into a cloning vector pUC119 at SmaI site, and the base sequence was determined by dideoxy method, which revealed that among total base sequence of the PCR fragment, the base sequence encoding variable regions of the heavy and light chains were respectively those shown in Sequence Listing Nos. 9 and 10.

The amino acid sequences of variable regions of heavy and light chains of antibody 1-3-1 produced by the above-mentioned hybridoma were deduced from the base sequences determined above and are respectively shown in Sequence Listing Nos. 11 and 12. The DNA fragment, the base sequence of which has been determined, can be prepared by means of DNA synthesizer with good reproducibility, and therefore, the acquisition of the DNA fragment does not require the repetition of the above procedure.

Example 7

25

Preparation of Adriamycin-Containing Liposome Bonded to Antibody GAH

a. Preparation of Thiolated Antibody

Anti-cancer antibody GAH (IgG) was dissolved in 0.1M - acetate buffer (pH4.0), and pepsin (1/40 mol) (Cooper Biomedical) was added thereto. The mixture was allowed to react overnight to prepare F(ab')₂. Chromatography over cation-exchange resin (mono S) (Pharmacia) isolated F(ab')₂. The solvent used was a linear gradient of 0.1M - acetate buffer (pH4.0) containing 0-0.5M NaCl. To the isolated F(ab')₂ in 0.1M - acetate buffer (pH4.5) containing 0.15M NaCl was added DTT at a ratio of 12 μ l of 10% DTT/1mg antibody. The mixture was left to stand at room temperature for 80 minutes. After completion of reaction, the mixture was passed through a gel filtration column (PD-10) equilibrated with PBS for desalification to obtain thiolated Fab'.

b. Thiolation of polyethylene/glycol

40

L-cysteine (48mg) was dissolved in 0.4M borate buffer (10ml), and 2,4-bis (polyethylene glycol)-6-chloro-s-triazine (200mg) (activated PEG 2) (Seikagaku Kogyo) was added thereto. The mixture was allowed to react at room temperature overnight. To the resultant PEG bonded with cysteine was added DTT (62mg), and the mixture was allowed to react at 37°C for 6 hours to obtain a solution containing PEG bonded with cysteine. The solution was gel filtrated (GH-25, Seikagaku Kogyo) for desalting, and the solvent was substituted by 10mM phosphate buffer (pH7.4) and 0.15M-NaCl (PBS). The solution was added to thiopropyl Sepharose 6B (Pharmacia) equilibrated with PBS, and non-bonded substances were washed away by PBS. Cysteine-binding PEG adsorbed to the gel was eluted out by PBS containing 50mM-DTT, which was then subjected to gel filtration to remove excessive DTT. This gave thiolated PEG.

50

c. Maleimidation of dipalmitoylphosphatidylethanolamine

Dipalmitoylphosphatidylethanolamine (127mg), N-(ϵ -maleimidocaproyloxy)succinimide (EMCS) (80mg), and triethylamine were added to a chloroform/methanol (5:1) solution (44 μ l), and the mixture was allowed to react for 3 hours under nitrogen gas. Additional EMCS (20mg) was added and the mixture was allowed to react at room temperature for further 3 hours. After confirmation of negative ninhydrin reaction of the reaction mixture, the mixture was evaporated to dryness under reduced pressure and the residue was dissolved in a trace amount of chloroform. The maleimidated dipalmitoylphosphatidylethanolamine thus

55

obtained was purified by chromatography over UNISIL (Gasukuro Kogyo) equilibrated with chloroform, using a chloroform/methanol (10:1) solution as an eluent.

d. Preparation of liposome containing adriamycin bearing maleimide group

5 Solid lipid mixture (100mg) (Nippon Seika), which consists of dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC), cholesterol (Chol), and maleimidated dipalmitoylphosphatidylethanolamine at a ratio of 18:10:0.5 (mol) was added to 0.3M citrate buffer (pH4) (1ml) and admixed. Freezing and thawing of the mixture was repeated 5 times to achieve hydration. This gave multimeric liposome. The liposome was charged in an extruder (Lipex Biomembranes) equipped with a polycarbonate membrane (Nucleopore; Microscience) having a pore size of 200nm and kept at 60°C. Repeated pressure-filtration (10 times) gave a dressed liposome. The liposome solution was neutralized with addition of 1M NaOH solution, and to the neutral solution was added one tenth (by weight) of adriamycin (Kyowa Hakko) with respect to the lipid components while being kept at 60°C. More than 97% of adriamycin was positively enclosed into the liposome according to the pH slope between the inside and outside of the liposome to give a liposome into which adriamycin bearing maleimide group had been encapsulated.

e. Binding of maleimide group-bearing adriamycin-encapsulated liposome to thiolated antibody and PEG modification

20 To the adriamycin-encapsulated liposome obtained above (lipid components: 100mg) was added thiolated Fab' antibody (5mg), and the mixture was allowed to react at 37°C for 8 hours. To the reaction mixture was added thiolated PEG (5μmol), and the mixture was allowed to react in PBS at room temperature for 6 hours to obtain adriamycin-encapsulated liposome bonded to antibody and modified with PEG. The latter was further subjected to gel filtration using Sepharose C16B (Pharmacia) to remove non-reacted cysteine-binding PEG.

Experiment 6

30 Confirmation of Pharmaceutical Effectiveness of Adriamycin-Encapsulated Liposome Bonded to Antibody GAH and Modified with PEG

Study on anti-cancer effect of antibody GAH was conducted in the manner as described below using human stomach cancer cell line MKN45 which had shown reactivity to antibody GAH and accumulative behavior in transplantation to nude mouse.

35 Cultured MKN45 cells (1×10^6) were subcutaneous-transplanted to nude mouse. Experiment started when the cancer weight became about 100μg after ten days from the transplantation (Fig. 5). Adriamycin-encapsulated liposome bonded to antibody GAH and modified with PEG was administered to mouse via caudal vein at a dose corresponding to 5mg/kg or adriamycin day 0, 3, 7 (shown by mark ○ in Fig. 5). As a control, phosphate buffered physiological saline (shown by mark ♦), adriamycin (shown by mark □), and adriamycin-encapsulated liposome modified with PEG (shown by mark ×) were administered to mice (each 6-7 animals). Time-course measurement of growth of cancer was conducted by means of Battle-Columbus method wherein presumptive cancer weight was determined according to the formulation : (short diameter) × (short diameter) × (long diameter)/2, and compared with that determined at the beginning of the experiment.

45 In Fig. 5, the abscissa shows time-lapse (days) after beginning of the experiment, and the mark (!) indicates the administration of the pharmaceutical formulation of the invention. Fig. 5 clearly shows that the formulation of the invention, adriamycin-encapsulated liposome bonded to antibody GAH, possesses potent anti-cancer effect. It is apparent, therefore, that human monoclonal antibodies of the invention allow continuous and long term "targeting therapy" of cancer tissue or organ with the help of anti-cancer agents or toxins.

SEQ ID NO:1

SEQUENCE LENGTH: 37 base pairs

5 SEQUENCE TYPE: nucleic acid

TOPOLOGY: linear

MOLECULE TYPE: cDNA

ORIGINAL SOURCE

10 human IgG antibody

G GCC CTT GGT GGA GGC TGA AGA GAC GGT GAC CAT TCT

37

15

SEQ ID NO:2

SEQUENCE LENGTH: 21 base pairs

SEQUENCE TYPE: nucleic acid

20 TOPOLOGY: linear

MOLECULE TYPE: cDNA

ORIGINAL SOURCE

human IgG antibody

25

TGG TGC AGC CAC AGT TCG TTT

21

30

SEQ ID NO:3

SEQUENCE LENGTH: 357 base pairs

SEQUENCE TYPE: nucleic acid

TOPOLOGY: linear

35 MOLECULE TYPE: cDNA

ORIGINAL SOURCE

CELL TYPE: Hybridoma producing human antibody GAH

40

CAG GTG CAG CTG CAG GAG TCG GGC CCA GGA CTG GTG AAG CCT TCA 45

CAG ACC CTG TCC CTC ACC TGC ACT GTC TCT GGT GGC TCC ATC AGC 90

AGT TGT GGT TTC TAC TGG AAC TGG ATC CGC CAG CAC CCA GGG AAG 135

45 GGC CTG GAG TGG ATT GGG TAC ATC TAT TAC AGT GGG AGC ACC TAC 180

TAC AAC CCG TCC CTC AAG AGT CGA GTT ACC ATA TCG CTA GAC ACG 225

50

55

TCT AAG AGC CAG TTC TCC CTG AAG CTG AGC TCT CTG ACT GCC GCG 270
 GAC ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGG TCT ACC CGA CTA CGG GGG 315
 GCT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACA ATG GTC ACC GTC TCT TCA 357

5

SEQ ID NO:4

SEQUENCE LENGTH: 342 base pairs

10

SEQUENCE TYPE: nucleic acid

TOPOLOGY: linear

MOLECULE TYPE: cDNA

ORIGINAL SOURCE

15

CELL TYPE: Hybridoma producing human antibody GAH

GAC ATC GTG ATG ACC CAG TCT CCA GAC TCC CTG GCT GTG TCT CTG 45
 GGC GAG AGG GCC ACC ATC AAC TGC AAG TCC AGC CAG AGT GTT TTA 90
 TAC AAC TCC AAC AAT AAG AAA TAC TTA GCT TGG TAC CAG CAG AAA 135
 CCA GGA CAG CCT CCT AAG CTG CTC ATT TAC TGG GCA TCT ACC CGG 180
 GAA TCC GGG GTC CCT GAC CGA TTC AGT GGC AGC GGG TCT GGG ACA 225
 GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG GCT GAA GAT GTG GCA 270
 GTT TAT TAC TGT CAG CAG TAT TAT AGT ACT CCG TGG ACG TTC GGC 315
 CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA CGA 342

25

SEQ ID NO:5

30

SEQUENCE LENGTH: 119 amino acids

SEQUENCE TYPE: amino acid

TOPOLOGY: linear

MOLECULE TYPE: protein

35

ORIGINAL SOURCE

CELL TYPE: Hybridoma producing human antibody GAH

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
 1 5 10 15
 Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser
 20 25 30

40

45

50

55

Ser Cys Gly Phe Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys
 35 40 45
 Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr
 5 50 55 60
 Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Leu Asp Thr
 65 70 75
 Ser Lys Ser Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Leu Thr Ala Ala
 10 80 85 90
 Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Thr Arg Leu Arg Gly
 95 100 105
 Ala Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 15 110 115 119

SEQ ID NO:6

20 SEQUENCE LENGTH: 114 amino acids

SEQUENCE TYPE: amino acid

TOPOLOGY: linear

MOLECULE TYPE: protein

25 ORIGINAL SOURCE

CELL TYPE: Hybridoma producing human antibody GAH

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu
 30 1 5 10 15
 Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu
 20 25 30
 Tyr Asn Ser Asn Asn Lys Lys Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
 35 35 40 45
 Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg
 50 55 60
 Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
 40 65 70 75
 Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala
 80 85 90

45

50

55

Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Trp Thr Phe Gly
 95 100 105

5 Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 110 114

SEQ ID NO:7

10 SEQUENCE LENGTH: 17 base pairs

SEQUENCE TYPE: nucleic acid

TOPOLOGY: linear

15 MOLECULE TYPE: cDNA

ORIGINAL SOURCE

human IgM antibody

20 C GAG GGG GAA AAG GGT T

17

SEQ ID NO:8

25 SEQUENCE LENGTH: 19 base pairs

SEQUENCE TYPE: nucleic acid

TOPOLOGY: linear

30 MOLECULE TYPE: cDNA

ORIGINAL SOURCE

human IgM antibody

35 G AAG CTC CTC AGA GGA GGG

19

SEQ ID NO:9

40 SEQUENCE LENGTH: 366 base pairs

SEQUENCE TYPE: nucleic acid

TOPOLOGY: linear

45 MOLECULE TYPE: cDNA

ORIGINAL SOURCE

CELL TYPE: Hybridoma producing human antibody 1-3-1

50

55

CAG CTG CAG CTG CAG GAG TCG GGC CCA GGA CTG GTG AAG CCT TCG 45
 GAG ACC CTG TCC CTC ACC TGC ACT GTC TCT GGT GGC TCC ATC AGC 90
 AGT AGT AGT TAC TAC TGG GGC TGG ATC CGC CAG CCC CCA GGG AAG 135
 GGG CTG GAG TGG ATT GGG AGT ATC TAT TAT AGT GGG AGC ACC TAC 180
 TAC AAC CCG TCC CTC AAG AGT CGA GTC ACC ATA TCC GTA GAC ACG 225
 TCC AAG AAC CAG TTC TCC CTG AAG CTG AGC TCT GTG ACC GCC GCA 270
 GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGG GGG AGC TAC GGG GGC TAC 315
 TAC TAC GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC 360
 TCC TCA 366

15 SEQ ID NO:10
 SEQUENCE LENGTH: 324 base pairs
 SEQUENCE TYPE: nucleic acid
 TOPOLOGY: linear
 20 MOLECULE TYPE: cDNA
 ORIGINAL SOURCE
 CELL TYPE: Hybridoma producing human antibody 1-3-1

25 TAT GAG CTG ACA CAG CCA CCC TCG GTG TCA GTG TCC CCA GGA CAG 45
 ACG GCC AGG ATC ACC TGC TCT GGA GAT GCA TTG CCA AAG CAA TAT 90
 GCT TAT TGG TAC CAG CAG AAG CCA GGC CAG GCC CCT GTG CTG GTG 135
 ATA TAT AAA GAC AGT GAG AGG CCC TCA GGG ATC CCT GAG CGA TTC 180
 30 TCT GGC TCC AGC TCA GGG ACA ACA GTC ACG TTG ACC ATC AGT GGA 225
 GTC CAG GCA GAA GAC GAG GCT GAC TAT TAC TGT CAA TCA GCA GAC 270
 AGC AGT GGT ACT TAT GAG GTA TTC GGC GGA GGG ACC AAG CTG ACC 315
 GTC CTA GGT 324

35
 40 SEQ ID NO:11
 SEQUENCE LENGTH: 122 amino acids
 SEQUENCE TYPE: amino acid
 TOPOLOGY: linear
 MOLECULE TYPE: protein
 ORIGINAL SOURCE

45

50

55

CELL TYPE: Hybridoma producing human antibody 1-3-1

[illegible]

SEQ ID NO:12

SEQUENCE LENGTH: 108 amino acids

SEQUENCE TYPE: amino acid

TOPOLOGY: linear

MOLECULE TYPE: protein

ORIGINAL SOURCE

CELL TYPE: Hybridoma producing human antibody 1-3-1

40	Tyr	Glu	Leu	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Val	Ser	Val	Ser	Pro	Gly	Gln
	1				5					10					15
	Thr	Ala	Arg	Ile	Thr	Cys	Ser	Gly	Asp	Ala	Leu	Pro	Lys	Gln	Tyr
					20					25					30

Ala Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val
 35 40 45
 5 Ile Tyr Lys Asp Ser Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Ser Ser Gly Thr Thr Val Thr Leu Thr Ile Ser Gly
 65 70 75
 10 Val Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Ala Asp
 80 85 90
 Ser Ser Gly Thr Tyr Glu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr
 95 100 105
 15 Val Leu Gly
 108

SEQ ID NO:13

20 SEQUENCE LENGTH: 8 amino acids

SEQUENCE TYPE: amino acid

TOPOLOGY: linear

MOLECULE TYPE: protein

25 ORIGINAL SOURCE

CELL TYPE: hybridoma producing human monoclonal antibody, an
 antigen to which exists on the surface of cancer cell membrane

30 Ile Ser Ser Xaa Xab Xac Tyr Trp

1

5

Xaa : Cys or Ser, Xab : Gly or Ser, Xac : Phe or Tyr

35 SEQ ID NO:14

SEQUENCE LENGTH: 12 amino acids

SEQUENCE TYPE: amino acid

40 TOPOLOGY: linear

MOLECULE TYPE: protein

ORIGINAL SOURCE

45

50

55

CELL TYPE: hybridoma producing human monoclonal antibody, an antigen to which exists on the surface of cancer cell membrane

5

Ile Gly Xaa Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr

1

5

10

Xaa : Tyr or Ser,

10

SEQ ID NO:15

SEQUENCE LENGTH: 4 amino acids

SEQUENCE TYPE: amino acid

15

TOPOLOGY: linear

MOLECULE TYPE: protein

ORIGINAL SOURCE

20

CELL TYPE: hybridoma producing human monoclonal antibody, an antigen to which exists on the surface of cancer cell membrane.

Gly Xaa Asp Xab

1

25

Xaa : Ala or Met, Xab : Tyr or Val

SEQ ID NO:16

SEQUENCE LENGTH: 9 amino acids

30

SEQUENCE TYPE: amino acid

TOPOLOGY: linear

MOLECULE TYPE: protein

ORIGINAL SOURCE

35

CELL TYPE: Hybridoma producing human antibody GAH

Ile Ser Ser Cys Gly Phe Tyr Trp Asn

1

5

40

SEQ ID NO:17

SEQUENCE LENGTH: 12 amino acids

45

50

55

SEQUENCE TYPE: amino acid
 TOPOLOGY: linear
 MOLECULE TYPE: protein
 ORIGINAL SOURCE
 CELL TYPE: Hybridoma producing human antibody GAH

Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr
 1 5 10

SEQ ID NO:18
 SEQUENCE LENGTH: 9 amino acids
 SEQUENCE TYPE: amino acid
 TOPOLOGY: linear
 MOLECULE TYPE: protein
 ORIGINAL SOURCE
 CELL TYPE: Hybridoma producing human antibody GAH

Ser Thr Arg Leu Arg Gly Ala Asp Tyr
 1 5

SEQ ID NO:19
 SEQUENCE LENGTH: 17 amino acids
 SEQUENCE TYPE: amino acid
 TOPOLOGY: linear
 MOLECULE TYPE: protein
 ORIGINAL SOURCE
 CELL TYPE: Hybridoma producing human antibody GAH

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Asn Ser Asn Asn Lys Lys Tyr Leu Ala
 1 5 10 15

SEQ ID NO:20

SEQUENCE LENGTH: 7 amino acids
 SEQUENCE TYPE: amino acid
 TOPOLOGY: linear
 MOLECULE TYPE: protein
 ORIGINAL SOURCE
 CELL TYPE: Hybridoma producing human antibody GAH

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
 1 5

SEQ ID NO:21
 SEQUENCE LENGTH: 9 amino acids
 SEQUENCE TYPE: amino acid
 TOPOLOGY: linear
 MOLECULE TYPE: protein
 ORIGINAL SOURCE
 CELL TYPE: Hybridoma producing human antibody GAH

Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Trp Thr
 1 5

SEQ ID NO:22
 SEQUENCE LENGTH: 10 amino acids
 SEQUENCE TYPE: amino acid
 TOPOLOGY: linear
 MOLECULE TYPE: protein
 ORIGINAL SOURCE
 CELL TYPE: Hybridoma producing human antibody 1-3-1

Ile Ser Ser Ser Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp
 1 5 10

SEQ ID NO:23

SEQUENCE LENGTH: 14 amino acids

SEQUENCE TYPE: amino acid

5 TOPOLOGY: linear

MOLECULE TYPE: protein

ORIGINAL SOURCE

10 CELL TYPE: Hybridoma producing human antibody 1-3-1

Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro.

15 1 5 10

SEQ ID NO:24

SEQUENCE LENGTH: 12 amino acids

20 SEQUENCE TYPE: amino acid

TOPOLOGY: linear

MOLECULE TYPE: protein

25 ORIGINAL SOURCE

CELL TYPE: Hybridoma producing human antibody 1-3-1

Gly Ser Tyr Gly Gly Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val

30 1 5 10

SEQ ID NO:25

35 SEQUENCE LENGTH: 9 amino acids

SEQUENCE TYPE: amino acid

TOPOLOGY: linear

40 MOLECULE TYPE: protein

ORIGINAL SOURCE

CELL TYPE: Hybridoma producing human antibody 1-3-1

45 Asp Ala Leu Pro Lys Gln Tyr Ala Tyr

1 5

50 SEQ ID NO:26

55

SEQUENCE LENGTH: 4 amino acids
 SEQUENCE TYPE: amino acid
 TOPOLOGY: linear
 MOLECULE TYPE: protein
 ORIGINAL SOURCE
 CELL TYPE: Hybridoma producing human antibody 1-3-1

Lys Asp Ser Glu
 1

SEQ ID NO:27
 SEQUENCE LENGTH: 11 amino acids
 SEQUENCE TYPE: amino acid
 TOPOLOGY: linear
 MOLECULE TYPE: protein
 ORIGINAL SOURCE
 CELL TYPE: Hybridoma producing human antibody 1-3-1

Gln Ser Ala Asp Ser Ser Gly Thr Tyr Glu Val
 1 5 10

SEQ ID NO:28
 SEQUENCE LENGTH: 24 base pairs
 SEQUENCE TYPE: nucleic acid
 TOPOLOGY: linear
 MOLECULE TYPE: cDNA
 ORIGINAL SOURCE
 CELL TYPE: hybridoma producing human monoclonal antibody, an
 antigen to which exists on the surface of cancer cell membrane

ATC AGC AGT WGT RGT TWC TAC TGG 28
 W : T or A, R : G or A

SEQ ID NO:29

SEQUENCE LENGTH: 36 base pairs

SEQUENCE TYPE: nucleic acid

TOPOLOGY: linear

MOLECULE TYPE: cDNA

ORIGINAL SOURCE

CELL TYPE: hybridoma producing human monoclonal antibody, an antigen to which exists on the surface of cancer cell membrane

ATT GGG WRY ATC TAT TAY AGT GGG AGC ACC TAC TAC 36
W : T or A, R : A or G, Y : C or T

SEQ ID NO:30

SEQUENCE LENGTH: 12 base pairs

SEQUENCE TYPE: nucleic acid

TOPOLOGY: linear

MOLECULE TYPE: cDNA

ORIGINAL SOURCE

CELL TYPE: hybridoma producing human monoclonal antibody, an antigen to which exists on the surface of cancer cell membrane

GGK RYK GAC KWC 12
K : G or T, R : G or A, Y : C or T
W : A or T

SEQ ID NO:31

SEQUENCE LENGTH: 27 base pairs

SEQUENCE TYPE: nucleic acid

TOPOLOGY: linear

MOLECULE TYPE: cDNA

ORIGINAL SOURCE

CELL TYPE: Hybridoma producing human antibody GAH

ATC AGC AGT TGT GGT TTC TAC TGG 27

5 SEQ ID NO:32
 SEQUENCE LENGTH: 36 base pairs
 SEQUENCE TYPE: nucleic acid
 TOPOLOGY: linear
 10 MOLECULE TYPE: cDNA
 ORIGINAL SOURCE
 CELL TYPE: Hybridoma producing human antibody GAH

15 ATT GGG TAC ATC TAT TAC AGT GGG AGC ACC TAC TAC 36

SEQ ID NO:33
 SEQUENCE LENGTH: 27 base pairs
 20 SEQUENCE TYPE: nucleic acid
 TOPOLOGY: linear
 MOLECULE TYPE: cDNA
 ORIGINAL SOURCE
 25 CELL TYPE: Hybridoma producing human antibody GAH

TCT ACC CGA CTA CGG GGG GCT GAC TAC 27

30 SEQ ID NO:34
 SEQUENCE LENGTH: 51 base pairs
 SEQUENCE TYPE: nucleic acid
 TOPOLOGY: linear
 35 MOLECULE TYPE: cDNA
 ORIGINAL SOURCE
 CELL TYPE: Hybridoma producing human antibody GAH

40 AAG TCC AGC CAG AGT GTT TTA TAC AAC TCC AAC AAT AAG AAA TAC TTA GCT
 51

45

50

55

SEQ ID NO:35

SEQUENCE LENGTH: 21 base pairs

SEQUENCE TYPE: nucleic acid

TOPOLOGY: linear

MOLECULE TYPE: cDNA

ORIGINAL SOURCE

CELL TYPE: Hybridoma producing human antibody GAH

TGG GCA TCT ACC CGG GAA TCC 21

SEQ ID NO:36

SEQUENCE LENGTH: 27 base pairs

SEQUENCE TYPE: nucleic acid

TOPOLOGY: linear

MOLECULE TYPE: cDNA

ORIGINAL SOURCE

CELL TYPE: Hybridoma producing human antibody GAH

CAG CAG TAT TAT AGT ACT CCG TGG ACG 27

SEQ ID NO:37

SEQUENCE LENGTH: 30 base pairs

SEQUENCE TYPE: nucleic acid

TOPOLOGY: linear

MOLECULE TYPE: cDNA

ORIGINAL SOURCE

CELL TYPE: Hybridoma producing human antibody 1-3-1

ATC AGC AGT AGT AGT TAC TAC TGG GGC TGG 30

SEQ ID NO:38

SEQUENCE LENGTH: 42 base pairs

SEQUENCE TYPE: nucleic acid

TOPOLOGY: linear
 MOLECULE TYPE: cDNA
 ORIGINAL SOURCE
 CELL TYPE: Hybridoma producing human antibody 1-3-1

ATT GGG AGT ATC TAT TAT AGT GGG AGC ACC TAC TAC AAC CCG 42

SEQ ID NO:39
 SEQUENCE LENGTH: 36 base pairs
 SEQUENCE TYPE: nucleic acid
 TOPOLOGY: linear
 MOLECULE TYPE: cDNA
 ORIGINAL SOURCE
 CELL TYPE: Hybridoma producing human antibody 1-3-1

GGG AGC TAC GGG GGC TAC TAC TAC GGT ATG GAC GTC 36

SEQ ID NO:40
 SEQUENCE LENGTH: 27 base pairs
 SEQUENCE TYPE: nucleic acid
 TOPOLOGY: linear
 MOLECULE TYPE: cDNA
 ORIGINAL SOURCE
 CELL TYPE: Hybridoma producing human antibody 1-3-1

GAT GCA TTG CCA AAG CAA TAT GCT TAT 27

SEQ ID NO:41
 SEQUENCE LENGTH: 12 base pairs
 SEQUENCE TYPE: nucleic acid
 TOPOLOGY: linear
 MOLECULE TYPE: cDNA
 ORIGINAL SOURCE

CELL TYPE: Hybridoma producing human antibody 1-3-1

AAA GAC AGT GAG 12

SEQ ID NO:42

SEQUENCE LENGTH: 33 base pairs

SEQUENCE TYPE: nucleic acid

TOPOLOGY: linear

MOLECULE TYPE: cDNA

ORIGINAL SOURCE

CELL TYPE: Hybridoma producing human antibody 1-3-1

CAA TCA GCA GAC AGC AGT GGT ACT TAT GAG GTA 33

Claims

1. A human monoclonal antibody specifically binding to a surface antigen of cancer cell membrane, said antibody being produced by a hybridoma obtained by cell fusion between human lymphocytes derived from cancer patient and mouse myeloma cells.
2. The human monoclonal antibody of Claim 1 wherein the variable region of the heavy chain of the antibody contains the amino acid sequences in Sequence Listing Nos. 13, 14, and 15.
3. The human monoclonal antibody of Claim 1 wherein the variable regions of the heavy and light chains of the antibody contain the amino acid sequences in Sequence Listing Nos. 16, 17, and 18, and 19, 20, and 21, respectively.
4. The human monoclonal antibody of Claim 1 wherein the variable regions of the heavy and light chains of the antibody are represented by the amino acid sequences in Sequence Listing Nos. 5 and 6 respectively.
5. The human monoclonal antibody of Claim 1 wherein the variable regions of the heavy and light chains of the antibody contain the amino acid sequences in Sequence Listing Nos. 22, 23, and 24, and 25, 26, and 27, respectively.
6. The human monoclonal antibody of Claim 1 wherein the variable regions of the heavy and light chains of the antibody are represented by the amino acid sequences in Sequence Listing Nos. 11 and 12 respectively.
7. An isolated DNA encoding the monoclonal antibody of Claim 1.
8. An isolated DNA encoding the monoclonal antibody of Claim 2.
9. The isolated DNA of Claim 8 wherein partial DNAs encoding the variable region of the heavy chain contains the base sequences in Sequence Listing Nos. 28, 29, and 30.
10. An isolated DNA encoding the monoclonal antibody of Claim 3.
11. The isolated DNA of Claim 10 wherein partial DNAs encoding the variable regions of the heavy and light chains of the antibody contain the base sequences in Sequence Listing Nos. 31, 32, and 33, and 34, 35, and 36, respectively.

12. An isolated DNA encoding the monoclonal antibody of Claim 4.
13. The isolated DNA of Claim 12 wherein partial DNAs encoding the variable regions of the heavy and light chains of the antibody are represented by the base sequences in Sequence Listing Nos. 3 and 4 respectively.
14. An isolated DNA encoding the monoclonal antibody of Claim 5.
15. The isolated DNA of Claim 14 wherein partial DNAs encoding the variable regions of the heavy and light chains of the antibody contain the base sequences in Sequence Listing Nos. 37, 38, and 39, and 40, 41, and 42, respectively.
16. An isolated DNA encoding the monoclonal antibody of Claim 6.
17. The isolated DNA of Claim 16 wherein partial DNAs encoding the variable regions of the heavy and light chains of the antibody are represented by the base sequences in Sequence Listing Nos. 9 and 10 respectively.
18. A hybridoma producing the monoclonal antibody of any of the Claims 1 to 6.
19. An anti-cancer formulation comprising the monoclonal antibody of one or more of the Claims 1 to 6, said antibody being bonded to the surface of a liposome enclosing an anti-cancer agent or toxin to cancer cells.
20. Use of a monoclonal antibody of one or more of the Claims 1 to 6 for the preparation of a pharmaceutical composition for the treatment of cancer.
21. Process of preparing a monoclonal antibody of one or more of the claims 1 to 6 by inserting genes containing the base sequences in Sequence Listing Nos. 3, 4, 9 and 10 into an expression vector, transforming an appropriate host cell with the expression vector, and culturing the resultant transformant.

Fig. 1

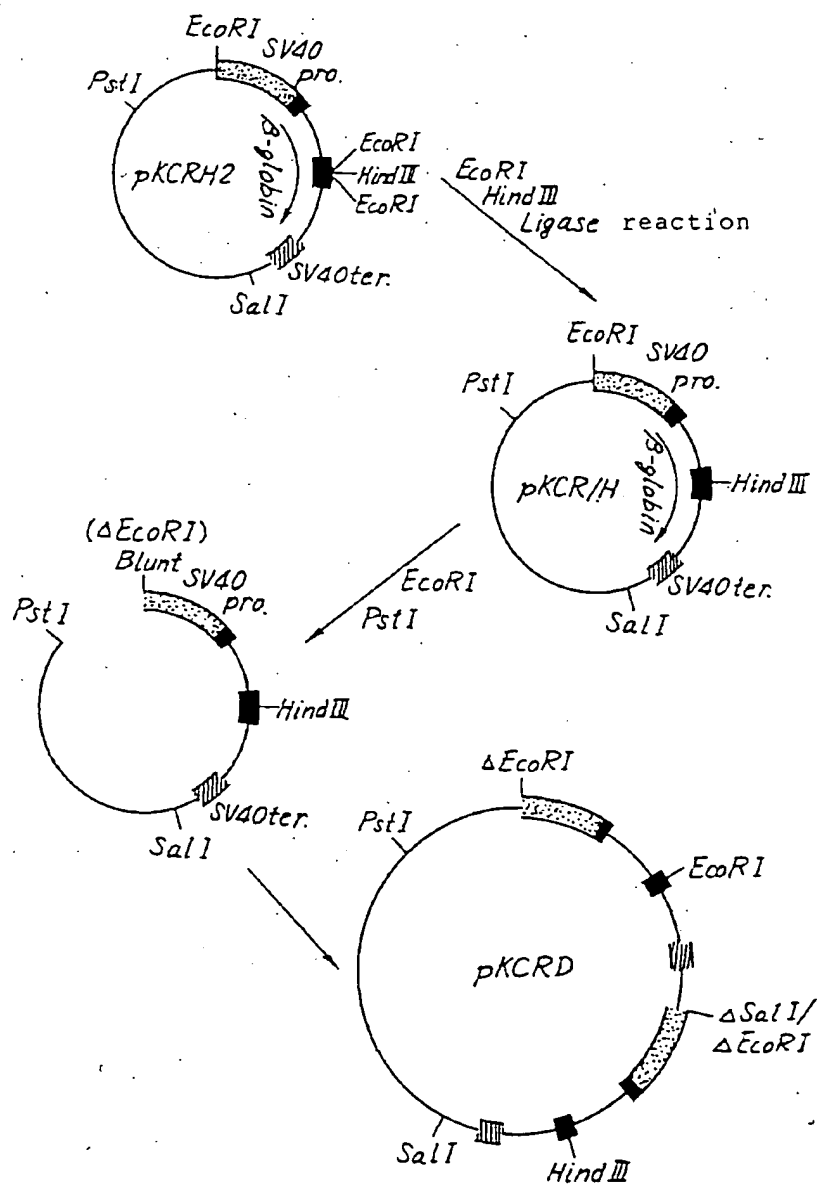


Fig. 2

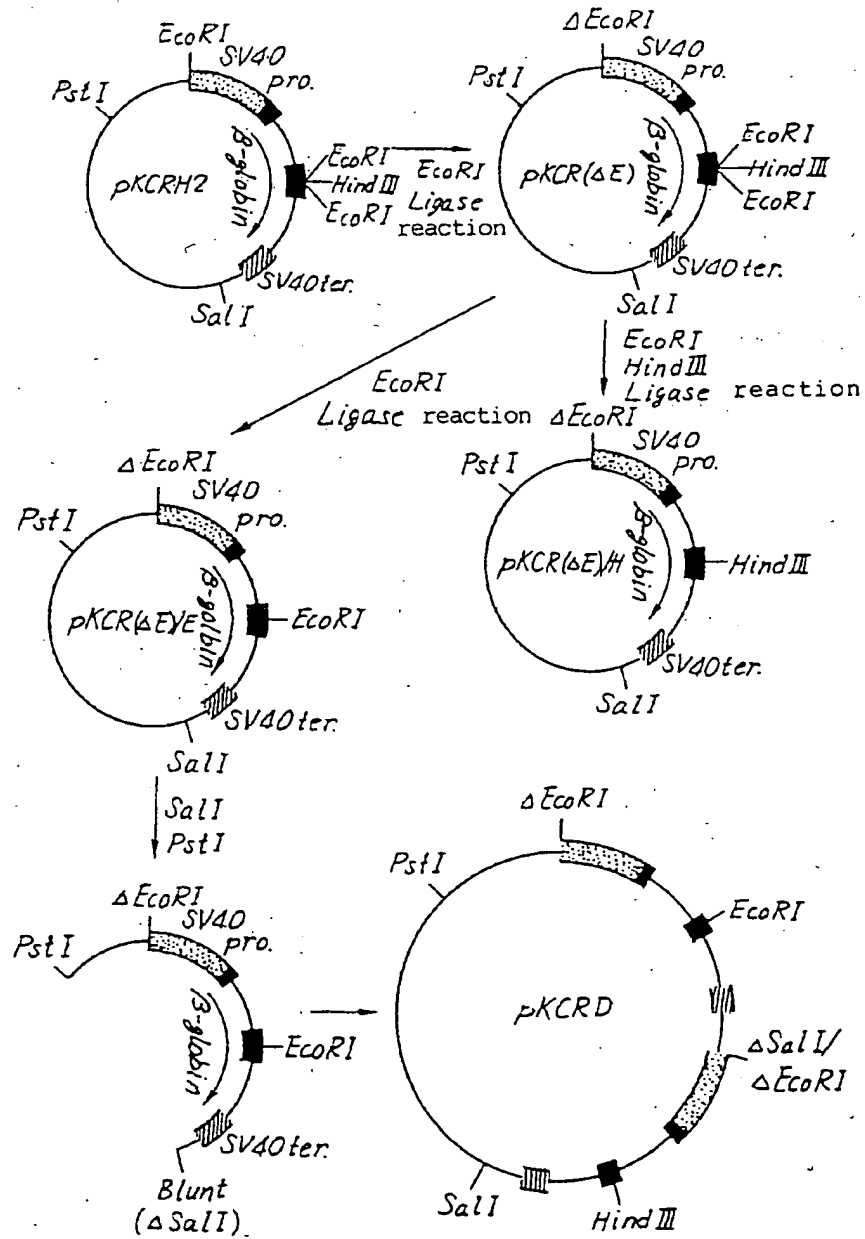


Fig. 3

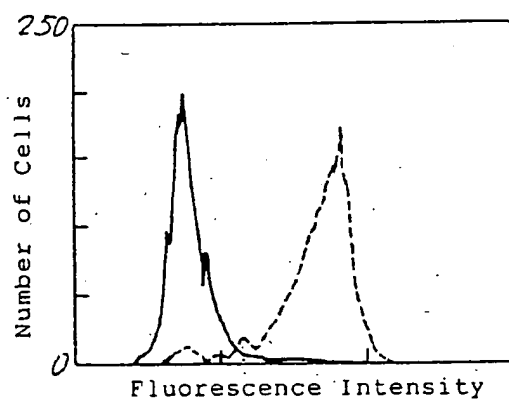


Fig. 4

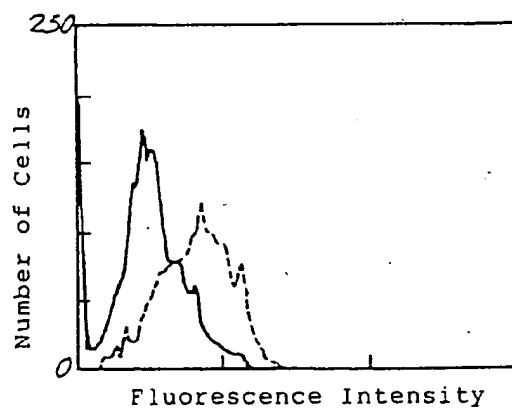
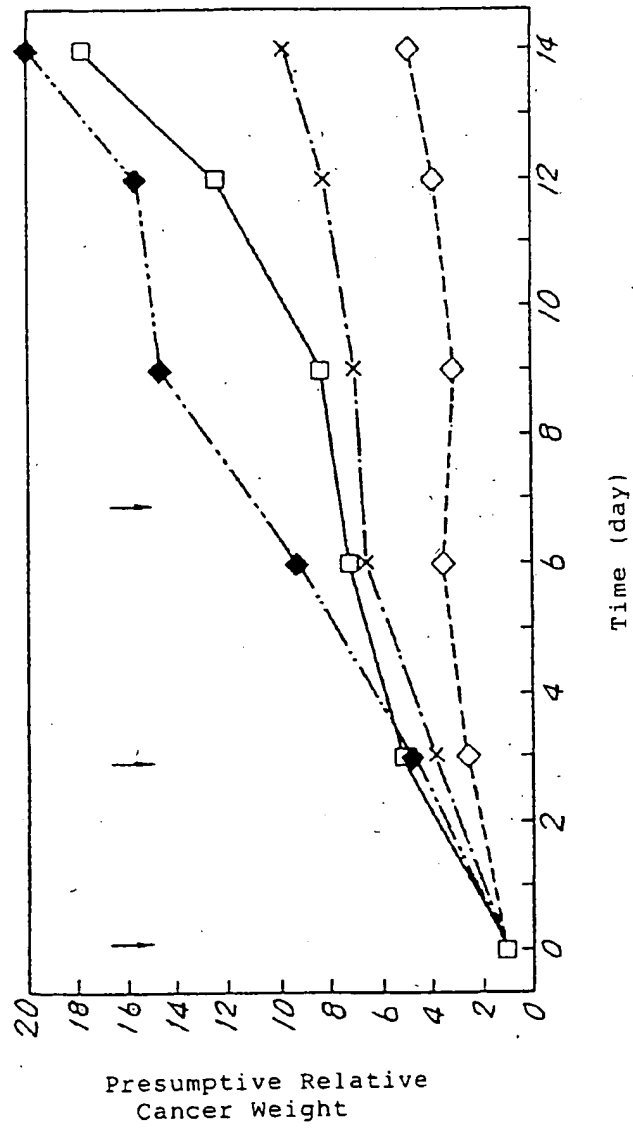


Fig. 5





European Patent
Office

EUROPEAN SEARCH REPORT

Application Number

EP 92110841.1

DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document with indication, where appropriate, of relevant passages	Relevant to claim
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 111, no. 13, September 25, 1989 Columbus, Ohio, USA KAZUHIRO YOSHIKAWA et al. "A human monoclonal antibody recognizing a surface antigen on stomach cancer cells.", page 503, column 2, abstract-no. 113 362y & Jpn. J. Cancer Res. 1989, 80(6), 546-53	1-18
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 100, no. 21, May 21, 1984 Columbus, Ohio, USA TAKASHI MASUKO et al. "Monoclonal antibodies against cell surface antigens present on human urinary bladder cancer cells.", page 474, column 1, abstract-no. 172 850b & J. Natl. Cancer Inst. 1984, 72(3), 523-30	1-6
A	WO - A - 91/09 134 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) * Claims 1, 27, 32, 33 *	1-6, 18-20
P, A	WO - A - 91/16 071 (RESEARCH DEVELOPMENT FOUNDATION) * Claims 1-10 *	1, 19, 20
A	EP - A - 0 178 891 (UNIVERSITY OF CALIFORNIA) * Claim 1 *	1, 18
A	WO - A - 90/14 595	1-6
The present search report has been drawn up for all claims		
Place of search VIENNA		Date of completion of the search 06-10-1992
		Examiner SCHARF
CATEGORY OF CITED DOCUMENTS		
X : particularly relevant if taken alone Y : particularly relevant if combined with another document of the same category A : technological background O : non-written disclosure P : intermediate document		
I : theory or principle underlying the invention E : earlier patent document, but published on, or after the filing date D : document cited in the application L : document cited for other reasons * : member of the same patent family, corresponding document		

EPO FORM 1203 (01.81) (P0401)



European Patent
Office

EUROPEAN SEARCH REPORT

Application Number

-2-

EP 92110841.1

DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document with indication, where appropriate, of relevant passages	Relevant to claim
	(SLOAN-KETTERING INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH) * Claims 1,2 * -----	
		CLASSIFICATION OF THE APPLICATION (Int. Cl. 5)
		TECHNICAL FIELDS SEARCHED (Int. Cl. 5)
The present search report has been drawn up for all claims		
Place of search VIENNA	Date of completion of the search 06-10-1992	Examiner SCHARF
CATEGORY OF CITED DOCUMENTS X: particularly relevant if taken alone Y: particularly relevant if combined with another document of the same category A: technological background O: non-written disclosure P: intermediate document T: theory or principle underlying the invention E: earlier patent document, but published on, or after the filing date D: document cited in the application L: document cited for other reasons Δ: member of the same patent family, corresponding document		